



Etude des effets neuroprotecteurs des stilbènes de la vigne sur la maladie de Parkinson

Hamza Temsamani

► To cite this version:

Hamza Temsamani. Etude des effets neuroprotecteurs des stilbènes de la vigne sur la maladie de Parkinson. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0433 . tel-01290204

HAL Id: tel-01290204

<https://theses.hal.science/tel-01290204>

Submitted on 17 Mar 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES ET VIE DE LA SANTE

SPÉCIALITÉ INTEFACE CHIMIE BIOLOGIE

Par Hamza TEMSAMANI

**ETUDE DES EFFETS NEUROPROTECTEURS DES
STILBENES DE LA VIGNE SUR LA MALADIE DE
PARKINSON**

Sous la direction de : Tristan RICHARD

Soutenue le 18/12/2015

Membres du jury :

M. Dominique DELMAS, Université de Bourgogne
Mme. Stéphanie KRISA, Université de Bordeaux
M. Tristan RICHARD, Université de Bordeaux
M. Cédric SAUCIER, Université de Montpellier II

Rapporteur
Présidente
Directeur de thèse
Rapporteur

Titre : Etude des effets neuroprotecteurs des stilbènes de la vigne sur la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est l'une des plus répandue dans le monde. Des analyses post mortem ont mis en évidence des inclusions dans les cerveaux des patients, composées d' α -synucléine. Plusieurs études ont visé à identifier des composés capables d'inhiber l'agrégation de cette protéine, étant donné que cette agrégation est liée à sa toxicité. Néanmoins, de nombreux composés restent encore à être identifiés afin de mettre en évidence des structures moléculaires actives partagées qui pourrait mener à la synthèse d'un principe actif. Les stilbènes sont des composés phénoliques démontrant régulièrement des activités biologiques intéressantes pour la santé. Dans cette étude, nous étudions le comportement anti-agrégatif des stilbènes monomériques (resvératrol, picéatannol) et oligomériques (ampélopsine, viniférine, et isohopeaphénol). Les résultats présentés mettent en évidence la capacité des stilbènes à inhiber l'agrégation de l' α -synucléine et fournissent des éléments pour comprendre ce mécanisme.

Mots clés : Maladie de Parkinson, α -synucléine, polyphénol, stilbène, neuroprotection.

Title: Study of vine stilbenes neuroprotective effects on Parkinson's disease

Abstract: Parkinson's disease is one of the most spread neurodegenerative diseases in the world. Post mortem analyses have put in evidence small inclusion bodies in patient's brain, composed of α -synuclein fibrils. Several studies attempted then to identify compounds that could inhibit α -synuclein aggregation, as its aggregation is linked to its toxicity [1]. Still, numerous active compounds need to be identified in order to put on relief shared active structures that could lead to a potent drug design. Stilbenes are phenolic compounds that often display interesting health-related biological activities. In this study, the anti-aggregative behavior of stilbenes monomers (resveratrol, piceatannol) and oligomers such as ampelopsin and isohopeaphenol was assessed. The results put on evidence stilbene propensity to inhibit α -synuclein aggregation and provide an insight into their inhibition mechanisms.

Keywords: Parkinson's disease, α -synuclein, polyphenol, stilbene, neuroprotection.

Groupe d'Etudes des Substances Végétales à Activités Biologiques

[EA3675, 210 Chemin de Leysotte CS 50008 F-33882 Villenave d'Ornon]

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, je vous suis reconnaissant d'avoir examiné mon manuscrit et de d'avoir participé à la soutenance de ces travaux de thèse. Mes remerciements aux professeur Dominique DELMAS et au professeur Cédric SAUCIER pour avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Merci au docteur Stéphanie KRISA de présider ce jury, mais aussi pour sa disponibilité et ses conseils qui ont été d'une aide précieuse pendant ces trois années.

Mes remerciements vont également au professeur Tristan RICHARD pour avoir dirigé cette thèse, pour sa disponibilité et pour son encadrement de qualité qui m'a permis de réaliser ces travaux dans les meilleures conditions.

Ma gratitude va également au professeur Jean-Michel MERILLON, directeur du laboratoire du Groupe d'Etude des Substances Végétales à Activité Biologiques, pour m'avoir accordé une place au sein de son équipe.

Je souhaite également remercier les personnes qui ont impacté les travaux de cette thèse.

Merci au docteur Grégory Dacosta pour son aide indispensable à la réalisation et l'exploitation des expériences RMN ainsi que pour ses explications précises.

Merci aussi au docteur Stéphanie Cluzet pour m'avoir conseillé sur les expériences d'électrophorèse.

Je remercie le docteur Ghislaine Hilbert pour avoir fourni les échantillons nécessaires à la réalisation d'un volet de cette thèse et le professeur Éric Gomez pour avoir accordé leur utilisation.

Je remercie Le docteur Marion Decossas pour le temps que nous avons consacré à l'observation d'échantillons en microscopie électronique et le professeur Olivier Lambert pour avoir permis ces observations.

Je remercie Sandrine Pottier pour avoir réalisé les acquisitions de dichroïsme circulaire et le professeur Arnaud Bondon pour avoir accepté et participé à ces acquisitions.

Surtout, mes remerciements vont aux membres de l'équipe du GESVAB qui ont fait le quotidien de cette thèse. Merci à Marie Laure Iglesias d'avoir été une collègue de bureau idéale et pour les nombreux échanges de recettes. Merci à Éric Pedrot pour sa disponibilité de tous les jours et pour sa bonne humeur. Merci à Antonio Palos-Pinto et à Gérard Fondeville dont l'aide précieuse a permis de surmonter de nombreux obstacles tout le long de cette thèse. Merci aussi à Elodie Renouf pour ses conseils lors de la réalisation des expériences de spectrométrie de masse. Merci aux docteurs Pierre Waffo-Teguo, Jean-Claude Delaunay et Alain Descendit pour leurs conseils sur les dispositifs de chromatographie liquide, ainsi qu'à l'ensemble de l'équipe du GESVAB.

Mes remerciements vont aussi aux nombreuses personnes que j'ai rencontrées durant ces trois ans et qui ont fait de ces années un concentré d'expériences uniques et inoubliables.

Merci à mes collègues d'AquiDoc, associations au sein de laquelle j'ai beaucoup appris. Merci à Delphine Charles et Renaud Borderie du concours MT180S, à Laura Owen, Quentin Cooper et tous les finalistes français et suisses du concours Famelab ainsi qu'à Blandine De La Rochebrochard de Cap Sciences pour m'avoir communiqué leur enthousiasme à partager la Science et avoir fait naître et développé une passion. Un grand merci également à Marc Labourdette et à toute l'équipe de BrainEducation pour leur sympathie, leur conseils et pour m'avoir permis de mettre un pied dans ma prochaine étape.

Merci à mes parents pour leur implications et leurs soutient indéfectible durant ces huit dernières années et pour m'avoir porté vers un nouvel horizon. Merci à mes amis pour leur présence et leurs encouragements. Merci à Estelle, tu as été mon meilleur support et la source de motivation m'ayant permis d'arriver au bout.

Merci à toutes les personnes que j'oublie de citer et qui ont participé de près ou de loin lors de la réalisation de cette thèse.

Liste des figures

Figure 1 - Aperçu de la première page de la publication de James Parkinson, paru en 1817.

Figure 2 - Les voies d'action de la dopamine

Figure 3 - La suractivation microgliale est neurotoxique

Figure 4 - Représentation de la protéine d' α -synucléine codée par le gène SNCA

Figure 5 - Représentation de la protéine LRRK2 codée par le gène LRRK2

Figure 6 - Représentation de la protéine parkin codée par le gène parkin

Figure 7 - Représentation de la protéine PINK1 codée par le gène PINK1

Figure 8 - Mécanismes moléculaires altérés lors de l'exposition à des facteurs environnementaux pouvant causer la MP.

Figure 9 - Mode d'action des thérapies antiparkinsoniennes

Figure 10 - Structuration d'un appareil de stimulation cérébrale profonde (ou DBS)

Figure 11 – Zoom sur les corps de Lewy

Figure 12 - Schéma de la progression de la MP au sein du cerveau selon le modèle de Braak

Figure 13 - Structure 3D de l' α -synucléine en interaction avec des micelles de SDS.

Figure 14 - Schéma décrivant les étapes de l'agrégation de l' α -synucléine

Figure 15 - Structures chimiques des polyphénols

Figure 16 - Biosynthèse du resvératrol

Figure 17 - Structures des stilbènes de la vigne

Figure 18 - Développement d'un athérome

Figure 19 - Evénements de la cascade amyloïde

Figure 20 - Méthodes de LC-RMN

Figure 21 - Déréplication des pics d'un extrait brut par LC-MS et LC-RMN

Figure 22 - Chromatogramme à 360 nm indiquant les flavonols contenus dans les extraits de baies de *Vitis vinifera* (cv. Cabernet Sauvignon)

Figure 23 – Spectres de RMN ^1H et de spectrométrie de masse du pic 5.

Figure 24 – Agrégation de l' α -synucléine

Figure 25 - Stilbènes étudiés dans le cadre de ces travaux

Figure 26 - Agrégation de l' α -synucléine seule et en présence de 100 μM de stilbènes

Figure 27 - Observation par MET de l'agrégation de l' α -synucléine

Figure 28 - Fibrilles d' α -synucléine

Figure 29 - Inhibition de l'agrégation de l' α -synucléine en fonction de la concentration en stilbènes

Figure 30 - Déstabilisation des fibrilles d' α -synucléine par les stilbènes

Figure 31 - Observation par MET de la déstabilisation des fibrilles d' α -synucléine

Figure 32 - Migration sur gel SDS-PAGE d'échantillons agrégés d' α -synucléine

Figure 33 - Spectres de dichroïsme circulaire de l' α -synucléine

Figure 34 - Spectre RMN ^1H de l' α -synucléine

Figure 35 - Spectre RMN ^1H de l' α -synucléine après additions d' ϵ -viniférine

Figure 36 - Affaïssement du spectre RMN ^1H de l' α -synucléine après addition d' ϵ -viniférine

Figure 37 - Variations des déplacements chimiques des protons de la protéine lors de la titration de l' α -synucléine par les stilbènes (ϵ -viniférine (A) et picéatannol (B))

Figure 38 - Spectre RMN ^1H de l' ϵ -viniférine après addition d' α -synucléine

Figure 39 - Spectre RMN ^1H de l' α -synucléine après additions de picéatannol

Figure 40 – Fuite de calcéine à travers les membranes perturbées de liposomes.

Figure 41 – Viabilité des cellules PC12 en fonction de la concentration d' α -synucléine agrégée.

Figure 42 – Restauration de la viabilité cellulaire par les stilbènes

Liste des tableaux

Tableau 1 - Critères de diagnostic de la maladie de Parkinson

Tableau 2 - Teneurs en flavonoïdes dans différentes sources alimentaires

Tableau 3 - Teneurs en polyphénols non-flavonoïdes dans différentes sources alimentaires

Tableau 4 - Activités biologiques du resvératrol

Tableau 5 – Données de chromatographie liquide et de spectrométrie de masse des flavonols détectés dans les espèces de *Vitis*

Tableau 6 - Teneurs en différents flavonols dans la peau des baies de raisins

Tableau 7 - Contenus en aglycones et dérivés de flavonols dans les espèces de *Vitis*

Liste des tableaux

Tableau 1 - Critères de diagnostic de la maladie de Parkinson

Tableau 2 - Teneurs en flavonoïdes dans différentes sources alimentaires

Tableau 3 - Teneurs en polyphénols non-flavonoïdes dans différentes sources alimentaires

Tableau 4 - Activités biologiques du resvératrol

Tableau 5 – Données de chromatographie liquide et de spectrométrie de masse des flavonols détectés dans les espèces de *Vitis*

Tableau 6 - Teneurs en différents flavonols dans la peau des baies de raisins

Tableau 7 - Contenus en aglycones et dérivés de flavonols dans les espèces de *Vitis*

Liste des symboles et des sigles

APP	Amyloid Precursor Protein
BA	Peptide β -amyloïde
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CBMN	Chimie et Biologie des Membranes et Nano-objets
CD	Circular Dichroism
CL	Corps de Lewy
COMT	Catechol-O-methyltransferase
COX-1	Cyclo-oxygénase 1
DBS	Stimulation cérébrale profonde
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EGCG	Epigallocatechine Gallate
EGFV	Ecophysiologie et Génomique Fonctionnelle de la Vigne
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FαS	α -synucléine sous forme fibrillaire
GESVAB :	Groupe d'Etude des Substances Végétales à Activités Biologiques
GSH	Glutathione sulfhydryl
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
INSEE	Institut national de la statistique et des études économiques
IL-1β	Interleukine 1 β
IL-6 :	Interleukine 6
INOS	Oxyde d'azote synthase inductible
LC-MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
LC-RMN	Chromatographie liquide couplée à la RMN
LDL	Low Density Lipoproteins
LRRK2	Leucine-rich repeat kinase 2
LUV	Large Unilamellar Vesicle
LVM	Large Multilamellar Vesicle

MAO	Monoamine oxidase
MET	Microscopie électronique à transmission
MP	Maladie de Parkinson
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium
NAC	Non-amyloid- β component
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
NF-κB	nuclear factor-kappa B
PARK2	Parkin RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase
PINK1	PTEN-induced putative kinase 1
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
RNS	Espèces réactives de l'azote
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SN	<i>Substantia nigra</i>
SNC	Système nerveux central
SNCA	Synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)
SPE	Solid phase extraction
ThT	Thioflavine T
TMS	Triméthylsilane
TNF-alpha	Tumoral necrose factor.
tr:	Temps de rétention

Table des matières

Introduction.....	6
Etude bibliographique.....	8
1 La maladie de Parkinson.....	9
1.1 Symptômes physiques	9
1.2 Neurones dopaminergiques	11
1.3 Origines et causes	12
1.3.1 Les microglies	13
1.3.2 Facteurs génétiques	16
1.3.3 Facteurs environnementaux.....	19
1.4 Cibles thérapeutiques et traitements	21
2 Maladie de Parkinson et α -synucléine	24
2.1 Les corps de Lewy.....	24
2.2 L' α -synucléine.....	26
2.3 Agrégation et toxicité de l' α -synucléine.....	28
2.3.1 Agrégation de l' α -synucléine	28
2.3.2 Perméabilisation des membranes	30
2.3.3 Induction de la neuro-inflammation	31
2.4 α -synucléine et polyphénols	31
3 Polyphénols de la vigne	32
3.1 Les flavonoïdes.....	33

3.1.1	Les flavonols	34
3.1.2	Les anthocyanes	34
3.1.3	Les flavanols	34
3.1.4	Les flavanones.....	35
3.2	Les non-flavonoïdes	35
3.2.1	Les acides phénoliques.....	36
3.2.2	Les lignanes.....	37
3.2.3	Les stilbènes	37
3.3	Propriétés des stilbènes.....	38
3.3.1	Sources	38
3.3.2	Activités biologiques.....	39
	Matériel et Méthodes.....	46
1	Purification et caractérisation de polyphénols	47
1.1	Extraction.....	47
1.2	Caractérisation par LC-MS.....	47
1.3	Caractérisation par LC-RMN	48
2	Suivi de l'agrégation de l' α -synucléine par mesure de la fluorescence de la thioflavine T	
2.1	Cinétiques d'agrégation.....	49
2.2	Mesure de déstabilisation des fibrilles d' α -synucléine.....	50
3	Observations par microscopie électronique	50
4	Etude par électrophorèse.....	51

5	Tests de viabilité cellulaire	52
6	Etude sur membrane modèle.....	54
7	Etude par dichroïsme circulaire	56
8	Etude par RMN	56
	Résultats.....	58
1	Caractérisation des flavonols de la vigne.....	59
1.1	LC-MS et LC-RMN.....	59
1.2	Flavonols des baies de raisin	61
2	Effets des stilbènes sur l'agrégation de l' α -synucléine.....	67
2.1	Etude de l'agrégation de l' α -synucléine	67
2.2	Inhibition de l'agrégation de l' α -synucléine par les stilbènes de la vigne	68
2.3	Déstabilisation des fibrilles d' α -synucléine.....	72
2.4	Etude par électrophorèse des agrégats formés.....	74
2.5	Etude par dichroïsme circulaire des agrégats formés	76
2.6	Etude par RMN de l'interaction synucléine/stilbènes	78
3	Effet des stilbènes sur la toxicité de l' α -synucléine	83
3.1	Membranes lipidiques modèles	83
3.2	Effets neuroprotecteurs de stilbènes sur des lignées neuronales PC12	85
	Conclusion et Perspectives.....	90
	Références	93
	Annexes.....	111

Introduction

Introduction

On estime que 5 millions de personnes sont atteintes par la maladie de Parkinson dans le monde (Fondation M. J. Fox pour la maladie de Parkinson)

(http://www2.michaeljfox.org/site/TR/TeamFox/TeamFox?pg=team&fr_id=1720&team_id=12571).

En Europe, ce sont plus d'un million de personnes qui sont touchées dont près de 150.000 en France (<http://www.franceparkinson.fr>). Ainsi, plus de 8000 personnes sont nouvellement diagnostiquées en France chaque année selon l'INSEE. Cette maladie constitue un problème de santé publique majeur. Les personnes atteintes ne sont plus en mesure de s'occuper d'elles-mêmes, et la survenue imprévue de perte de contrôle moteur les incite à s'isoler, engendrant perte d'estime de soi et de dignité. Les patients se disent prisonniers de leur corps. La maladie de Parkinson devient de plus en plus invalidante au fur du temps.

A l'heure actuelle il n'existe pas de solution thérapeutique contre cette maladie. Les traitements existants agissent uniquement sur les symptômes moteurs de la maladie. La recherche visant à comprendre les mécanismes biologiques mis en cause dans cette maladie est encore incomplète malgré toutes les études réalisées.

Les polyphénols sont des composés naturels présents en grande quantité dans de nombreuses sources végétales. Ces composés sont reconnus pour leurs nombreuses propriétés biologiques : activités anti-oxydantes, prévention des cancers, des maladies cardiovasculaires et des maladies neurodégénératives. On retrouve aussi ces polyphénols en quantités importantes dans les boissons du quotidien comme le café, le thé ou encore le vin. Le vin est la source alimentaire principale des stilbènes, composés dérivants du resvératrol. Il a été démontré que ces composés possèdent de nombreuses propriétés biologiques allant de la prévention de maladies cardiovasculaire à la lutte contre le vieillissement. Des études menées par plusieurs laboratoires, dont le nôtre, ont mis en évidence la capacité des stilbènes à prévenir la maladie d'Alzheimer, maladie neurodégénérative la plus répandue devant la maladie de Parkinson.

Mes travaux de thèse, conduit au Groupe d'Etude des Substances Végétales à Activités Biologiques (GESVAB) de l'Université de Bordeaux, se situent dans le cadre de l'étude des

propriétés biologiques des polyphénols de la vigne. Cette étude vise à étudier les effets neuroprotecteurs des polyphénols de la vigne en général et des stilbènes en particulier sur la maladie de Parkinson.

Bien que la plupart de mes travaux ont portés sur les stilbènes, la première partie de mes travaux de thèses a été consacrée à développer des outils analytiques pour caractériser de façon globale des extraits de baies de raisin. Ces travaux ont conduit au développement du couplage entre chromatographie liquide et spectrométrie RMN (LC-RMN) pour la caractérisation des flavonols des baies de raisin.

La seconde partie de mes travaux de thèse a été consacrée à l'étude de la capacité des stilbènes à prévenir l'agrégation de l' α -synucléine. L'agrégation de cette protéine est l'une des principales causes de la maladie de Parkinson. Nous avons donc souhaité identifier des stilbènes inhibiteurs de cette agrégation, ainsi que leur mécanisme d'interaction avec l' α -synucléine. Dans cette optique, des premiers tests ont été réalisés par la mesure de la fluorescence de la thioflavine T pour caractériser l'activité anti-agrégative des stilbènes. Les résultats obtenus ont ensuite été confirmés par des observations directes en microscopie électronique à transmission. Les agrégats formés en présence de stilbènes ont été étudiés par migration sur gel en SDS-PAGE. Ces travaux ont été complétés par des expériences de dichroïsme circulaire et de RMN.

Enfin, le comportement biologique de ces agrégats d' α -synucléine et de stilbènes a été étudié. Nous avons d'abord étudié la capacité des stilbènes à neutraliser la capacité de l' α -synucléine agrégée à perméabiliser des membranes lipidiques modèles mimant celle des neurones. Nous avons également déterminé le comportement neuroprotecteur des stilbènes en analysant leur capacité à restaurer la viabilité cellulaire de cellules PC12 exposés aux agrégats de l' α -synucléine et de stilbènes.

Etude Bibliographique

1 La maladie de Parkinson

Les maladies neurodégénératives sont des pathologies découlant de la dysfonction ou de la dégénération des neurones. A l'heure actuelle, les facteurs d'apparitions et de développement de ces pathologies ne sont pas totalement élucidés, cependant elles ont souvent pour point commun l'accumulation et le comportement anormal de protéines. Elles peuvent réduire les facultés motrices ou mentales. Les altérations des fonctions cognitives sont l'effet de pathologies comme la maladie d'Alzheimer. Les altérations des fonctions motrices, plus fréquentes, sont causés par des pathologies comme la maladie de Parkinson (MP) ou encore celle de Huntington. Ce sont des maladies handicapantes pour lesquelles il n'existe pas de traitement à l'heure actuelle. Parmi ces pathologies, les maladies d'Alzheimer et Parkinson se distinguent par leur prévalence. La maladie d'Alzheimer est la maladie neurodégénérative la plus contractée par la population de séniors d'âge supérieur à 65 ans. En effet, une personne sur huit au-dessus de 65 ans est touchée par cette pathologie (Association Alzheimer 2009). La maladie de Parkinson (MP) est la seconde maladie neurodégénérative la plus contractée. Les symptômes apparaissent aux alentours de 60 ans, âge auxquels près de 3% de la population est touchée (Kowal, Dall et al. 2013). Le risque augmente avec l'âge jusqu'à atteindre 5% à 85 ans. Les patients souffrent de rigidité, parfois douloureuse, de tremblements localisés ainsi que de bradykinésie ou d'akinésie ralentissant et entravant leurs mouvements.

1.1 Symptômes physiques

Les symptômes de la MP ont été observés et décrits par James Parkinson en 1817. Parkinson avait alors décrit cette pathologie comme une « paralysie agitante » (Figure 1).

Les symptômes cliniques reconnus de la MP sont des dysfonctionnements moteurs (Parkinson's disease Foundation). Ces symptômes sont décrits ci-après :

- Le tremblement : Aux premiers stades de la maladie, les tremblements sont localisés. Ils peuvent se limiter à la main et/ou au bras. Néanmoins, certains patients parkinsoniens n'en manifestent pas.
- La rigidité : La raideur des membres et des articulations des patients parkinsoniens est localisée dans le cou ou encore dans les jambes. C'est une raideur musculaire qui atteint une grande majorité des patients, et qui peut aussi être source de douleurs lors d'une contraction trop importante des muscles.

- La bradykinésie ou l'akinésie : Les patients parkinsoniens souffrent d'un ralentissement de leur mouvement, ils se déplacent lentement avec une posture courbée. A un stade plus développé de la maladie, l'initiation même du mouvement devient difficile. On parle alors d'akinésie.
- L'instabilité posturale : La posture des patients parkinsoniens s'affaisse au cours du développement de la maladie du fait d'une perte d'équilibre. Les personnes se voient contraintes de se déplacer en se penchant en avant ou encore en arrière.

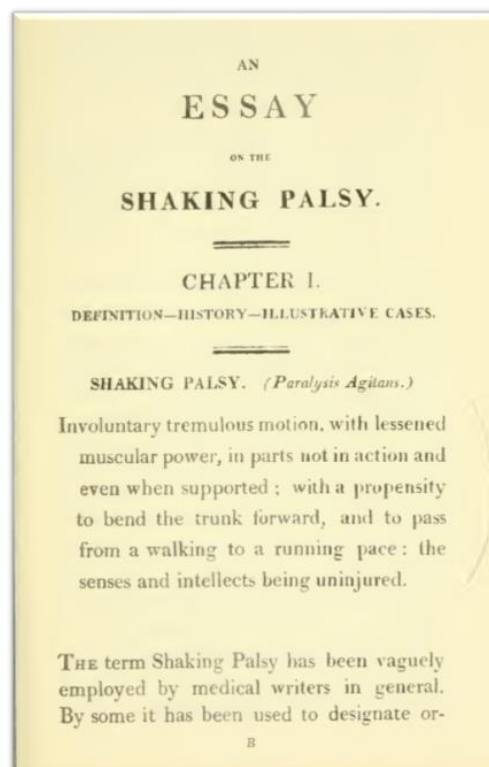


Figure 1 - Aperçu de la première page de la publication de James Parkinson, paru en 1817.

Les travaux de James Parkinson furent les premiers à décrire la maladie qui porte aujourd'hui son nom. Il y était fait référence en tant que « paralysie agitante ».

Il faudra attendre la fin des années 90 pour qu'un consensus soit adopté à propos des critères permettant de diagnostiquer la pathologie. Ces critères ont été définies par le travail de Gelb et de ses collègues (Gelb, Oliver et al. 1999). Dans cet ouvrage, le diagnostic de la pathologie est nuancé sur 3 niveaux : Possible, Probable et Certain. Les critères de chacun de ces niveaux de diagnostic sont présentés dans le tableau 1.

Parkinson	Possible	<p>Deux des quatre caractéristiques du groupe A sont présentes, dont une est la bradykinesie</p> <p>Et</p> <p>Soit aucune des caractéristiques du groupe B n'est présente. OU Les symptômes sont présents depuis moins de trois ans et aucunes des caractéristiques du groupe B n'est présente.</p> <p>Et</p> <p>Soit une réponse significative et régulière à la Levodopa ou à un agoniste de la dopamine OU Le patient n'as pas eu un traitement adéquat à la Levodopa ou à un agoniste de la dopamine</p>
	Probable	<p>Au moins trois des quatre caractéristiques du groupe A sont présentes</p> <p>Et</p> <p>Aucune des caractéristiques du groupe B n'est présente. (Ce prérequis n'est rempli que si les symptômes sont présents depuis au moins trois ans.)</p> <p>Et</p> <p>Une réponse significative et régulière à la Levodopa ou à un agoniste de la dopamine</p>
	Certain	<p>Tout les critères pour un Parkinson 'possible' sont remplis</p> <p>Et</p> <p>Confirmation histologique du diagnostique à l'autopsie</p>

Tableau 1 - Critères de diagnostic de la maladie de Parkinson.
Ces critères ont été établis par Gelb et ses collègues (Gelb, Oliver *et al.* 1999). Les critères se nivèlent sur trois états de diagnostic: Possible, probable et certain.

1.2 Neurones dopaminergiques

La dopamine est un des neurotransmetteurs les plus étudiés à ce jour. Ce neurotransmetteur est impliqué dans plusieurs mécanismes tels que ceux de la récompense, de la locomotion et de l'affection. La perturbation de la production de cette molécule est impliquée dans plusieurs pathologies neurologiques et mentales.

Les neurones dopaminergiques sont la source de dopamine dans le système nerveux central (SNC) des mammifères. Les neurones dopaminergiques forment un groupe de cellules hétérogènes, leurs fonctions sont variées (Figure 2). Ces cellules se trouvent au niveau du diencephale, du mésencéphale et du bulbe olfactif. Cependant, la grande majorité des neurones dopaminergiques est localisée dans le mésencéphale. Le mésencéphale est lui-même divisé en plusieurs structures sous-corticales, dont la *substantia nigra* (SN). Cette structure contient la grande majorité des neurones dopaminergiques du cerveau. Les neurones dopaminergiques de la SN sont riches en mélanine et en fer. Il est important de noter que ces neurones sont afférents aux ganglions de la base et en particulier au striatum responsable de la réalisation de mouvements volontaires. Cinq pour cent des neurones au sein de la SN sont des

neurones dopaminergiques. Cette structure ainsi que celles qui lui sont connectées sont donc très sensibles à tout dommage de ces neurones. Les premiers symptômes moteurs de la MP apparaissent lorsque près de 30% des neurones dopaminergiques de la SN sont perdus (Fearnley and Lees 1991).

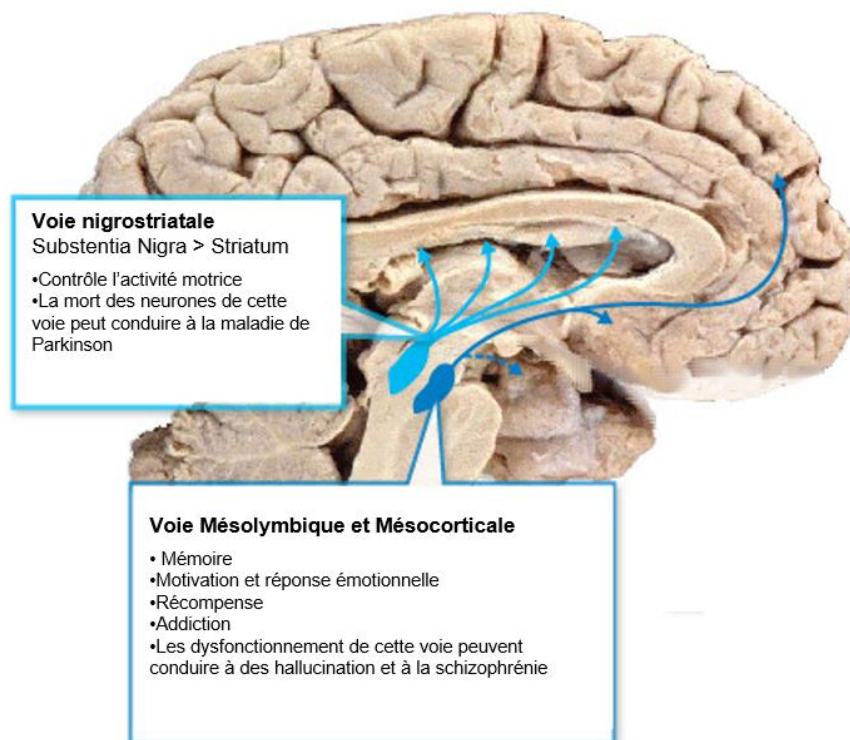


Figure 2 - Les voies d'action de la dopamine (source : Medlibes).

La dopamine est un neurotransmetteur utilisé dans deux voies de signalisation dans le cerveau : la voie nigrostriatale responsable de l'activité motrice, et les voies mésolymbiques et mésocorticales responsables du système de récompense et impliquées dans la mémoire. La variation du niveau de dopamine dans le cerveau à un impact sur les comportements efférents de ces voies.

1.3 Origines et causes

La MP est une maladie complexe et multifactorielle. La cause principale de l'apparition de la MP n'est autre que le vieillissement (Reeve, Simcox et al. 2014). Les neurones de la SN perdent peu à peu leur capacité à s'adapter et réagir aux variations de leur environnement. La sensibilité de ces neurones (au stress oxydant notamment) est telle que dans ces conditions

une perturbation bénigne pour un individu jeune peut causer la dégénérescence des neurones chez un individu âgé.

Néanmoins, la MP est également liée à d'autres facteurs comme l'environnement ou le patrimoine génétique. La mort ou la dysfonction des neurones dopaminergiques peuvent être directement dus à l'action des facteurs génétiques et environnementaux (Warner and Schapira 2003). Ces facteurs peuvent aussi être indirectement toxiques pour les neurones en induisant l'inflammation cérébrale (McGeer and McGeer 2008, Russo, Bubacco et al. 2014). Ces deux origines ne sont pas pour autant distinctes l'une de l'autre car une synergie peut avoir lieu et une combinaison de conditions génétiques et environnementales peuvent causer un phénotype parkinsonien (Peng, Oo et al. 2010).

1.3.1 Les microglies

Les microglies sont des cellules immunitaires (Kraft and Harry 2011). Elles opèrent un rôle de surveillance de la stabilité du milieu environnant les neurones. Ces cellules sont 'muettes' dans des conditions physiologiques normales. Dans ces conditions, elles permettent l'élagage synaptique, le processus permettant d'éliminer les synapses peu actives pour favoriser les synapses les plus actives.

Un contact avec des facteurs extracellulaires tels que des organismes pathogènes ou des éléments cellulaires altérés provoque une activation des microglies, causant une réponse inflammatoire et la production de molécules signal (Hanisch 2002).

Une fois activées, les microglies sont capables de sécréter des agents dont la fonction est de neutraliser la source du stimulus pro-inflammatoire. De plus, ces cellules vont réguler la réponse inflammatoire, soit en permettant de prolonger ses signaux par la production d'agents pro-inflammatoires qui vont activer à leur tour d'autres microglies, soit par l'émission de produits anti-inflammatoires.

Les agents produits par les microglies et dont la fonction est de neutraliser la source du stimulus pro-inflammatoire sont de deux types : des radicaux libres d'oxygène (ROS) ou d'azote (RNS), ainsi que des agents pro-inflammatoires tels que les cytokines. Les radicaux libres vont permettre de neutraliser la source pathogène. En effet, les microglies expriment en grande quantité une NADPH oxydase responsable de la production d'espèces oxydantes. L'activité de cette protéine est induite lors de l'activation des microglies par un stimulus pro-

inflammatoire (Purisai, McCormack et al. 2007). Les cytokines sont des petits polypeptides se divisant entre deux groupes de cytokines anti-inflammatoires et de cytokines pro-inflammatoires. La production de cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-1 β , TNF- α et IL-6 va induire l'apoptose par l'activation des caspases, une réponse immunitaire, ou encore l'amplification de l'émission d'agent cytotoxique tels que les ROS et les RNS. Le TNF- α induit une forte dégénérescence des neurones dopaminergiques, sa toxicité est plus faibles envers d'autre neurones ou cellules gliales (McGuire, Ling et al. 2001).

L'activation des microglies est donc un phénomène essentielle pour la l'élimination d'agents pathogènes. En temps normal, cette activation est régulée et la sécrétion de ROS et cytokines destinés à neutraliser l'agent infectieux est donc limitée en magnitude et dans le temps (Saijo, Crotti et al. 2013). Cependant, l'exposition chronique à un agent pro-inflammatoire exogène (pesticides, métaux) ou endogène (protéine dysfonctionnelle) va induire une activation persistante des microglies et une inflammation chronique.

Il a été observé que l'activation persistante des microglies conduit à une neuro-inflammation et à une perte importante des neurones dopaminergiques de la SN (Lull and Block 2010). Ces neurones sont particulièrement sensibles au stress oxydant. En effet la dopamine qu'ils contiennent est relâchée dans le milieu extracellulaire lors de leur dégénérescence. Sous l'action de la monoamine oxydase (MAO) la dopamine est désaminé et forme des radicaux libres toxiques. De plus, la SN est la sous-structure la plus riche en microglies dans le cerveau, ce qui expose particulièrement les neurones dopaminergiques qu'elle contient lors d'une inflammation cérébrale (Gao, Jiang et al. 2002). Enfin, la libération de la neuromélanine hors des neurones dopaminergiques lors de leur dégénérescence contribue aussi à amplifier ce phénomène. La neuromélanine possède la capacité d'activer les microglies, et donc la libération de TNF- α . Rappelons que le nom de la *substantia nigra*, ou substance noire, est due à la forte concentration en mélanine de ses neurones.

Ces dommages dus au stress oxydant provoqué par l'activation des microglies vont conduire à la dégénérescence et la mort des neurones dopaminergiques (Nunomura, Moreira et al. 2007) (Figure 3).

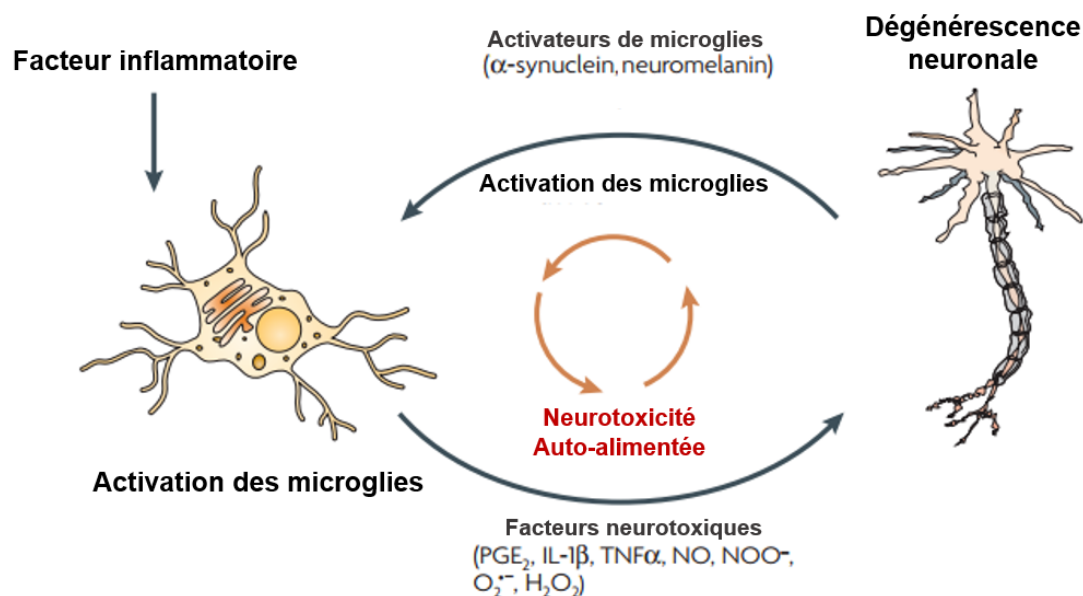


Figure 3 - La suractivation microgliale est neurotoxique (d'après de Block, Zecca *et al.* 2007).

La suractivation des microglies par un stimulus extérieur (tel que le LPS) induit la libération de facteurs neurotoxiques pro-inflammatoires qui vont causer la dégénérescence neuronale. Les neurones ainsi endommagés vont libérer des produits capables d'activer d'autres microglies. Ces événements alimentent un cycle entre la suractivation des microglies et la dégénérescence neuronale. (NO : oxyde nitrique; NOO^- : peroxynitrite; $\text{O}_2^{\bullet-}$: anion superoxyde; PGE_2 : prostaglandine E_2 ; $\text{TNF}\alpha$: facteur α de nécrose tumorale).

Dans le cadre de la MP, une exposition à des ROS ou des RNS provoque des dommages au niveau des lipides, des protéines et de l'ADN. Des observations post-mortem ont permis de constater une quantité élevée de produits de la peroxydation des lipides, ainsi que des protéines et d'ADN oxydés au niveau du SNC des patients atteints par la MP (McGeer, Klegeris *et al.* 2005). Pour appuyer cette sensibilité des neurones dopaminergiques vis-à-vis des microglies, il est démontré que la survie des neurones dopaminergique est modulable par l'utilisation de composés activateurs ou inhibiteurs de l'activation microgliales.

D'une part des molécules telles que les MPTP (1 - méthyle 4 - phényle 1, 2, 3,6-tétrahydro pyridine) et le 6-OHDA (6-hydroxydopamine) sont capables de provoquer directement l'activation des microglies. De ce fait, elles conduisent à la perte des neurones dopaminergiques (Sugama, Yang *et al.* 2003, Rodriguez-Pallares, Parga *et al.* 2007).

D'un autre côté, le DPI (diphenylene iodonium) est une molécule capable d'inhiber PHOX, la protéine responsable de la production de ROS par les microglies. Cette molécule a des effets

thérapeutiques sur les maladies inflammatoires. De plus, elle aurait une activité neuroprotectrice avérée sur des modèles Parkinsoniens de rat (Qian, Gao et al. 2007)

Bien que l'inflammation cérébrale joue un rôle prépondérant dans la MP, ce n'est pas la seule cause de la maladie. Des facteurs génétiques et environnementaux peuvent aussi conduire directement à la dégénérescence neuronale. Cela dit, ces facteurs vont aussi induire une inflammation par le biais des microglies.

1.3.2 Facteurs génétiques

Bien que 90% des cas constatés sont d'origine sporadique, le patrimoine génétique est la cause de l'apparition de la maladie de Parkinson chez 5% des patients (Klein and Westenberger 2012). Des études épidémiologiques et génétiques ont permis d'identifier certains gènes qui sont directement liés à l'apparition et au développement de la MP.

Les mutations génétiques pouvant causer la MP sont nombreuses et à l'heure actuelle on dénombre près de 915 gènes dont les mutations sont liées à la MP (Lill, Roehr et al. 2012). Néanmoins 4 gènes sont responsables de la majorité des cas idiopathiques de cette maladie. Il s'agit des gènes SNCA, LRRK2, PINK1, et PARK2. (Kruger, Kuhn et al. 1998, Di Fonzo, Rohé et al. 2005, Jones 2010).

Le gène SNCA (Figure 4) code pour l' α -synucléine, une protéine impliquée dans le relargage de neurotransmetteurs (Liu, Ninan et al. 2004). Les mutations du gène SNCA sont rares. On dénombre 3 mutations liées à la MP : Ala53Thr, Ala30Pro et Glu46Lys (Kruger, Kuhn et al. 1998, Spira, Sharpe et al. 2001, Zarranz, Alegre et al. 2004). Ces 3 mutations sont situées dans la partie N-terminale de la protéine. De plus, des duplications ainsi que des triplications du gène sont possibles et ont été identifiées chez différentes familles (Singleton, Farrer et al. 2003, Fuchs, Nilsson et al. 2007).

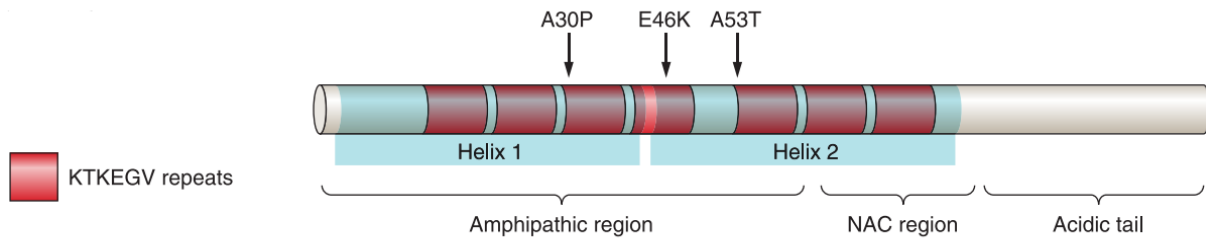


Figure 4 - Représentation de l' α -synucléine codée par le gène SNCA (Corti, Lesage et al. 2011).

L' α -synucléine est une protéine de 140 acides aminés. Elle possède des répétitions de séquence KTKEGV localisées dans la partie N-terminale, une région centrale hydrophobique propice à l'agrégation (NAC) et une partie C-terminale non-structurée. Les mutations faux-sens sont indiquées au-dessus de la protéine.

Le gène LRRK2 (Figure 5) code pour la protéine du même nom (Leucine-rich Repeat Kinase 2). Cette protéine contient plusieurs domaines à activité enzymatique ainsi que plusieurs domaines favorisant des interactions entre protéines. A l'heure actuelle, ses fonctions dans l'organisme ne sont pas totalement élucidées. Néanmoins LRRK2 serait impliqué dans la régulation du cytosquelette, la dégradation autophagique des protéines et la circulation des vésicules, et d'autres fonctions encore (Rideout and Stefanis 2014). Plus de 80 mutations de ce gène ont été identifiées, mais seules 6 d'entre elles seraient en cause dans le développement de la MP : Arg1441Cys, p.Arg1441Gly, p.Tyr1699Cys, p.Gly2019Ser et p.Ile2020Thr (Di Fonzo, Rohé et al. 2005, Gilks, Abou-Sleiman et al. 2005).

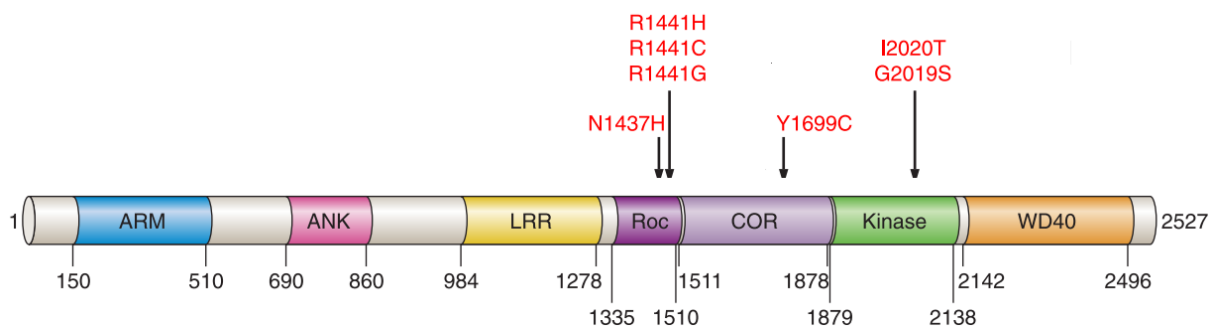


Figure 5 - Représentation de la protéine LRRK2 codée par le gène LRRK2 (d'après Corti, Lesage et al. 2011).

LRRK2 est une protéine de 2527 acides aminés. Elle présente des domaines conservés. Les mutations impliquées dans le développement de la MP sont indiquées au-dessus de la protéine.

Parkin (ou PARK2) (Figure 6) exprime une protéine dont le rôle est de marquer les protéines dysfonctionnelles ou en excès pour leur dégradation par le protéasome. De plus parkin est impliquée dans l'autophagie des mitochondries (Narendra, Tanaka et al. 2008).

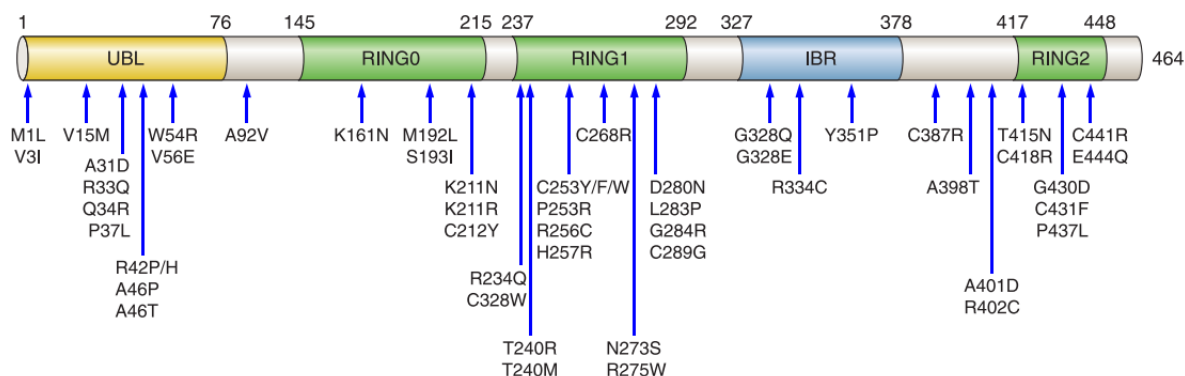


Figure 6 - Représentation de la protéine parkin codée par le gène parkin (d'après Corti, Lesage et al. 2011).

Parkin est une protéine de 465 acides aminés. Les mutations faux-sens sont indiquées au-dessous de la protéine.

Enfin, le gène PINK1 code pour la protéine PINK1 (Figure 7). C'est une serine / thréonine kinase qui se localise sur les membranes mitochondriales et qui permet la réponse des mitochondries aux stress oxydant (Valente, Salvi et al. 2004). Parmi les individus porteurs de mutations pouvant induire la MP, près de 6% sont porteurs de mutations du gène PINK1.

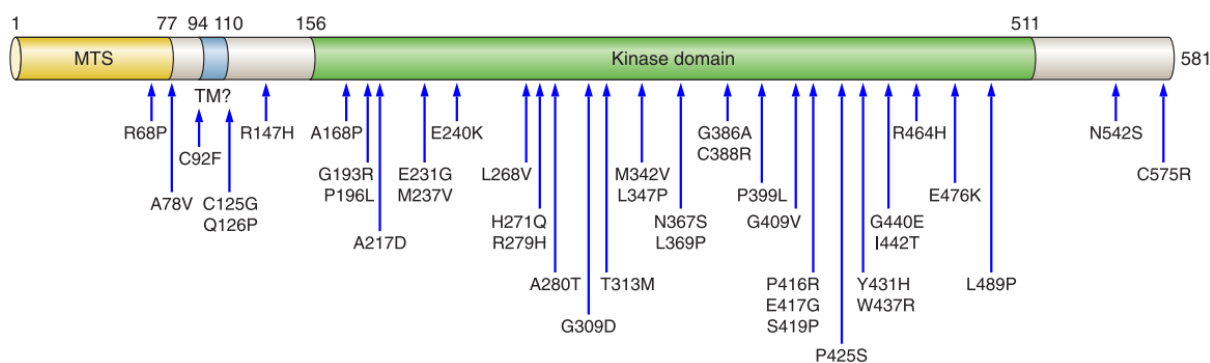


Figure 7 - Représentation de la protéine PINK1 codée par le gène PINK1 (d'après (Corti, Lesage et al. 2011).

PINK1 est une protéine de 581 acides aminés. Les mutations faux-sens sont indiquées au-dessous de la protéine.

Parkin et PINK1 sont deux protéines indispensables à la dégradation des mitochondries défectueuses par les protéasomes. La mutation de l'un de ces deux gènes conduit à une perte de fonction, et donc à l'accumulation de mitochondries défectueuses qui vont causer un stress oxydant important au niveau des neurones et favoriser ainsi leur dégénérescence (Jones 2010).

1.3.3 Facteurs environnementaux

1.3.3.1 Métaux

Les métaux tels que le fer ou le plomb ont la capacité de s'accumuler dans la SN et de générer un stress oxydant. Ces métaux peuvent ainsi accroître le risque de développer la MP (Kuhn, Winkel et al. 1998, Zecca, Youdim et al. 2004).

La capacité du fer à induire la MP n'est pas encore bien établie. Néanmoins, bien que le fer soit un élément essentiel dans la biologie du corps humain, la perturbation de son homéostasie peut favoriser l'apparition de la MP à travers sa capacité à induire la formation de ROS (Sian-Hülsmann, Mandel et al. 2011). La ceruloplasmine est une feroxydase qui oxyde le Fe^{2+} est qui participe à la circulation de métal en dehors et au sein de la cellule (Zecca, Youdim et al. 2004). Des mutations causant la perte de fonction de cette enzyme conduisent à l'apparition de symptômes parkinsoniens et à l'accumulation de fer dans la SN de certains patients (Hochstrasser, Tomiuk et al. 2005). De plus, il a été démontré que le fer est capable de favoriser l'agrégation de l' α -synucléine (Xu and Chan 2015), induisant la toxicité de celle-ci envers les neurones de la SN.

Parmi tous les métaux le plomb serait un important facteur d'augmentation de risque de contracter la MP. L'étude de Kuhn *et al.* (Kuhn, Winkel et al. 1998) met en avant que l'exposition à des batteries sulfate-plomb pendant une trentaine d'année a conduit au développement de la MP chez 80% des patients inclus dans l'étude. Des études similaires mettent en évidence ce risque lié à l'exposition au plomb (Coon, Stark et al. 2006, Weisskopf, Weuve et al. 2010). Ce métal favoriserait l'agrégation de l' α -synucléine et réduirait la sécrétion de dopamine (Yamin, Glaser et al. 2003) (Figure 8).

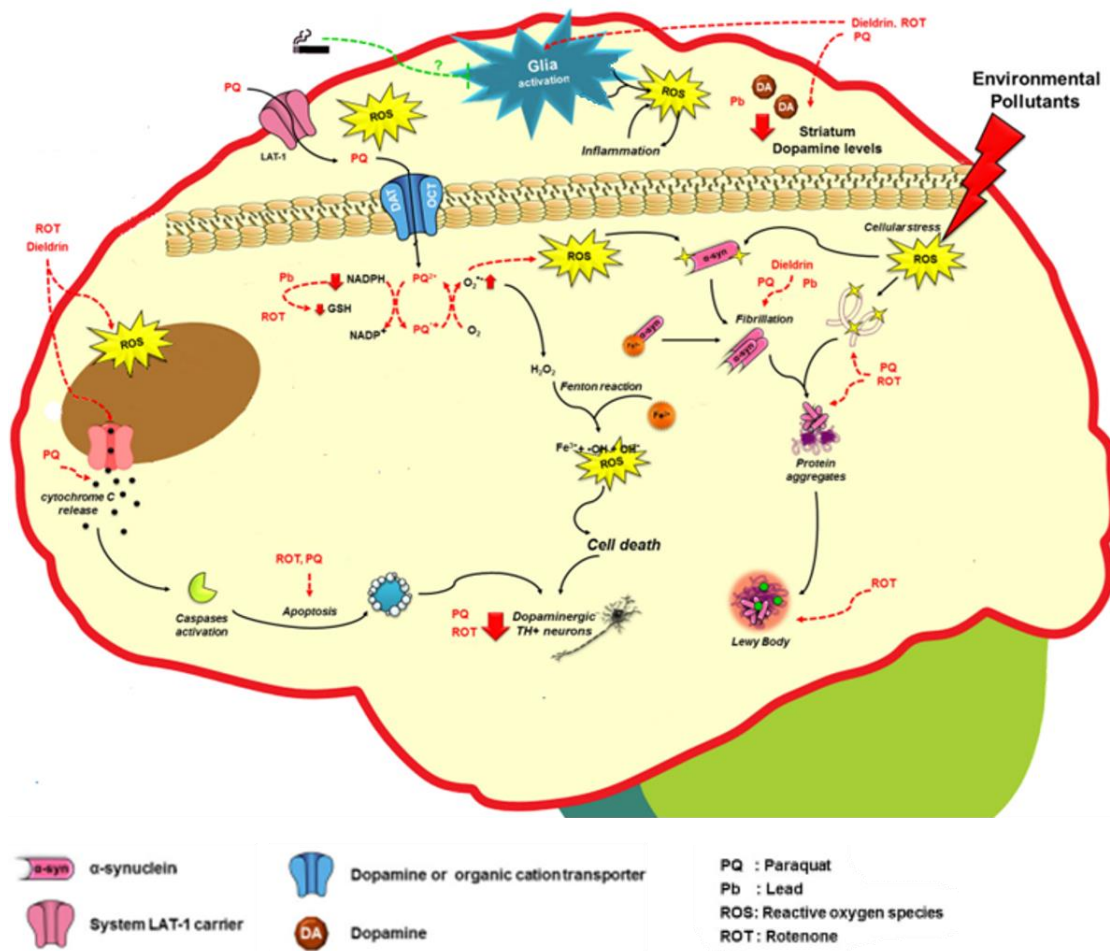


Figure 8 - Mécanismes moléculaires altérés lors de l'exposition à des facteurs environnementaux pouvant causer la MP, d'après (Chin-Chan, Navarro-Yepes et al. 2015). L'exposition à des facteurs environnementaux tels que les pesticides ou certains métaux comme le plomb peut être responsable de la dégénérescence des neurones dopaminergiques dans la SN. Ces éléments toxiques conduisent à un dysfonctionnement des mitochondries et à l'activation des microglies, induisant donc la production de ROS toxiques pour les neurones et participants à l'apparition de la MP.

1.3.3.2 Pesticides

La relation entre l'exposition aux pesticides et le développement de la MP est établie et longuement étudiée. Une méta-analyse de 31 études épidémiologiques et toxicologiques réalisées jusqu'en 2003 a confirmé la corrélation entre exposition aux herbicides et insecticides avec le risque d'apparition de la MP (Brown, Rumsby et al. 2006). De plus, une étude *post mortem* de cerveaux de patients parkinsoniens a mis en évidence les taux anormalement élevés de pesticides chez ces patients (Fleming, Mann et al. 1994).

Deux études épidémiologiques ont démontré le lien entre l'utilisation de la Dieldrin et l'apparition de la MP chez des fermiers (Kamel, Tanner et al. 2007, Tanner, Kamel et al. 2011). La figure 8 présente les mécanismes d'actions favorisant l'apparition de la MP de différents pesticides : Dieldrin, Paraquat et Roténone.

La Dieldrin, un insecticide organochloré capable de traverser la barrière hémato encéphalique (BHE), conduit à la diminution de la quantité de dopamine dans le cerveau et augmente la quantité de ROS dans les neurones dopaminergiques (Kitazawa, Anantharam et al. 2001).

L'exposition à un autre pesticide, le paraquat, est associé à l'apparition de la MP (Wang, Costello et al. 2011). Le paraquat est un pesticide capable de traverser la BHE et d'être incorporé au niveau des terminaisons nerveuses des neurones dopaminergiques via les canaux transporteurs de dopamine (Rappold, Cui et al. 2011). Cette molécule réduit la disponibilité de la forme réduite du glutathion (GSH). Le GSH joue un rôle antioxydant essentiel dans les cellules, la diminution de sa quantité génère un stress oxydant important. Dans des modèles animaux, le paraquat augmente les ROS, réduit le nombre de neurones dopaminergiques de la SN et provoque l'activation des microglies ainsi que l'agrégation de l' α -synucléine (Manning-Bog, McCormack et al. 2002, Wu, Block et al. 2005, Purisai, McCormack et al. 2007).

De même, l'exposition et/ou l'utilisation de la roténone augmente de 2,5 à 10% les risques de contracter Parkinson (Tanner, Kamel et al. 2011). La roténone est un autre pesticide capable de traverser la BHE. Il inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire ce qui va conduire à une défaillance énergétique, à la production de ROS ainsi qu'au relargage du cytochrome C. La roténone va conduire à l'activation des microglies et à l'agrégation de l' α -synucléine (Figure 8).

1.4 Cibles thérapeutiques et traitements

A l'heure actuelle il n'existe pas de solution thérapeutique contre la MP, mais des traitements pour atténuer les symptômes moteurs de la maladie. La recherche visant à comprendre les mécanismes biologiques mis en cause dans cette maladie est encore incomplète malgré toutes les études réalisées.

Les patients Parkinsoniens présentent de faibles taux de dopamine. La principale cible des traitements est donc le remplacement de ce neurotransmetteur en déficience à cause de la mort des neurones dopaminergiques. Les patients sont traités avec des agonistes de la dopamine qui

interagissent avec les récepteurs de cette molécule. La levodopa, le précurseur de la dopamine, est le traitement le plus commun. Cette molécule peut traverser la BHE pour être ensuite métabolisée en dopamine (Olanow 2008).

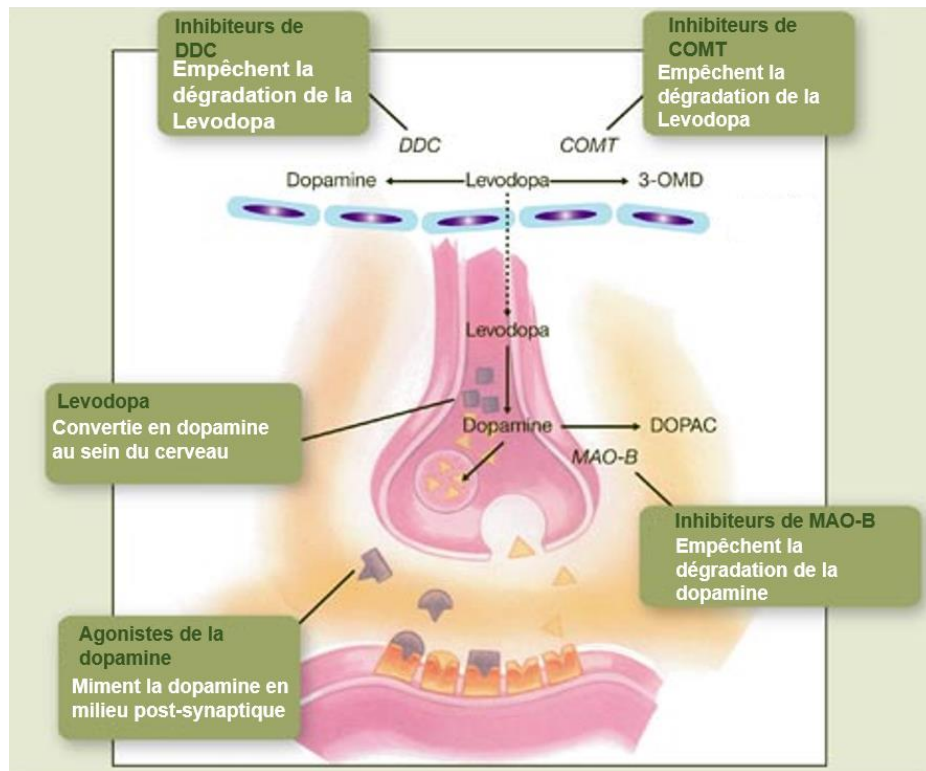


Figure 9 - Mode d'action des thérapies antiparkinsonniennes.
Les thérapies antiparkinsonniennes visent à rétablir les niveaux de dopamine suite à la dégénérescence des neurones dopaminergiques.

La levodopa réduit les symptômes de la MP en restaurant les niveaux de dopamine dans la *substantia nigra* après sa métabolisation en dopamine. Cette molécule a la capacité de franchir la BHE. Cependant ce traitement présente des limites. En effet, quand la perte de neurones dopaminergiques est trop importante, la levodopa ne peut plus compenser le déficit en dopamine qui en résulte. Cela arrive cinq ou sept ans après le début du traitement. La conséquence de ce déficit accru est l'apparition de fluctuations motrices durant lesquelles les mouvements du patient sont ralentis : on distingue alors des phases 'on-off' où le patient peut se souffrir subitement d'un blocage du mouvement (phase off) avant de pouvoir retrouver le contrôle de ses gestes (phase on) (LeWitt 2008). D'autres stratégies thérapeutiques visent à améliorer la disponibilité de levodopa en prévenant la métabolisation de celle-ci en 3-o-

méthyl dopa par la catéchol-o-méthyltransférase. La même approche est utilisée lors d'administration d'inhibiteurs de la monoamine oxydase B, une enzyme responsable du catabolisme de la dopamine au sein des neurones (Figure 9) (Olanow 2008).

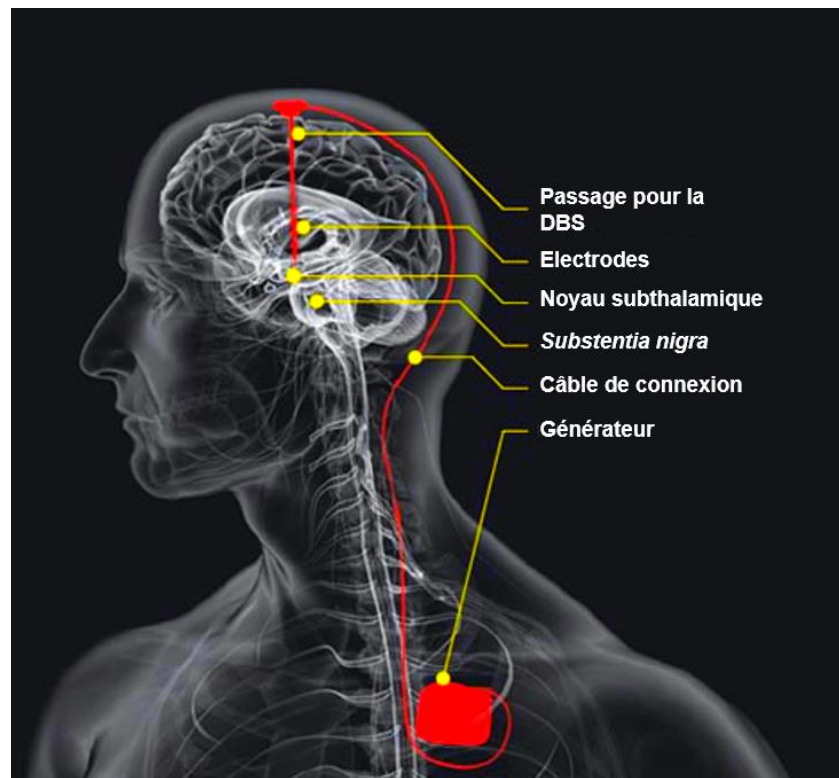


Figure 10 - Structuration d'un appareil de stimulation cérébrale profonde.

Des stimulations électriques sont envoyées au thalamus du patient par le biais d'électrodes implantées dans le noyau subthalamique. Cette stimulation du thalamus améliore l'activité motrice altérée par la dégénérescence des neurones dopaminergiques (d'après le rapport de l'ACD BRAIN working group).

Un autre traitement permet une amélioration notable de la condition des patients parkinsoniens. C'est une intervention chirurgicale invasive. La stimulation cérébrale profonde (ou DBS pour Deep Brain Stimulation) est une technique chirurgicale durant laquelle une ou deux électrodes sont implantées dans une région spécifique du cerveau (Figure 10). Elle est proposée aux patients ne réagissant pas ou présentant une intolérance à la levodopa. Les électrodes sont reliées à un générateur d'impulsions qui envoie des stimulations électriques au cerveau afin de modifier l'activité neuronale dans la région ciblée. Les régions alors ciblées sont le noyau subthalamique et le segment interne du globus pallidus des ganglions de la base. Le courant électrique agit sur les synapses, provoque le relargage de neurotransmetteurs par les astrocytes (Kendall H. Lee, Su-Youne Chang et al. 2004), augmente le flux sanguins et

stimule la neurogenèse (Vedam-Mai, van Battum et al. 2012). La DBS augmente la durée des périodes on de près de 6h, montrant son efficacité pour soulager les symptômes moteurs de la MP.

2 Maladie de Parkinson et α -synucléine

L'identification de l' α -synucléine a été réalisée grâce à l'observation d'inclusions protéiques dans les cerveaux des patients atteints de la MP. Ces inclusions sont absentes chez les patients sains. Elles portent le nom de « Corps de Lewy » (CL) (Holdorff, Rodrigues e Silva et al. 2013). Les CL sont composés majoritairement d'une protéine agrégée en fibrilles, appelée α -synucléine. Il existe donc un lien étroit entre l'agrégation de l' α -synucléine et la MP. A l'heure actuelle le rôle exacte de cette protéine dans l'apparition et le développement de la MP n'est toujours pas été totalement élucidé.

2.1 Les corps de Lewy

En 1912, Friedrich Heinrich Lewy est le premier à s'intéresser à l'aspect anatomo-pathologique de la MP. Dans ses deux publications de 1912 et 1913 (Holdorff, Rodrigues e Silva et al. 2013), ainsi que dans son livre 'Tonus und Bewegung', il étudie 85 patients atteints de la maladie de leur vivant et *post-mortem*. F.H. Lewy y décrit la présence typique de corps dans le cytoplasme des cellules nerveuses, alors décrits comme 'corps Hyalin'. Ce n'est qu'en 1919 que Konstantin Tretiakoff, alors neuropathologiste à Paris, leur donnera le nom de 'Corps de Lewy' et indiquera que leur localisation est essentiellement au niveau de la SN. L'ultrastructure de ces corps est observée 40 ans plus tard par microscopie électronique (Roy and Wolman 1969) (Figure 11).

Cependant, il faudra attendre les travaux de Spillantini *et al.* pour qu'une description plus précise de ces corps soit réalisée (Spillantini, Crowther et al. 1998). Ils démontrent que les CL sont formés d'un amas de fibres constituées d' α -synucléine.

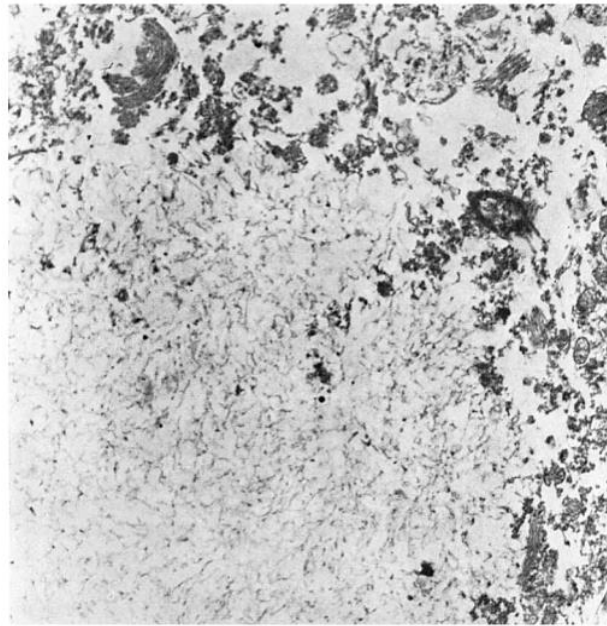


Figure 11 – Zoom sur Corps de Lewy (Roy and Wolman 1969).
Grossissement x5700 en microscopie électronique, on observe que le Corps de Lewy est constitué dans sa quasi-totalité par des fibrilles.

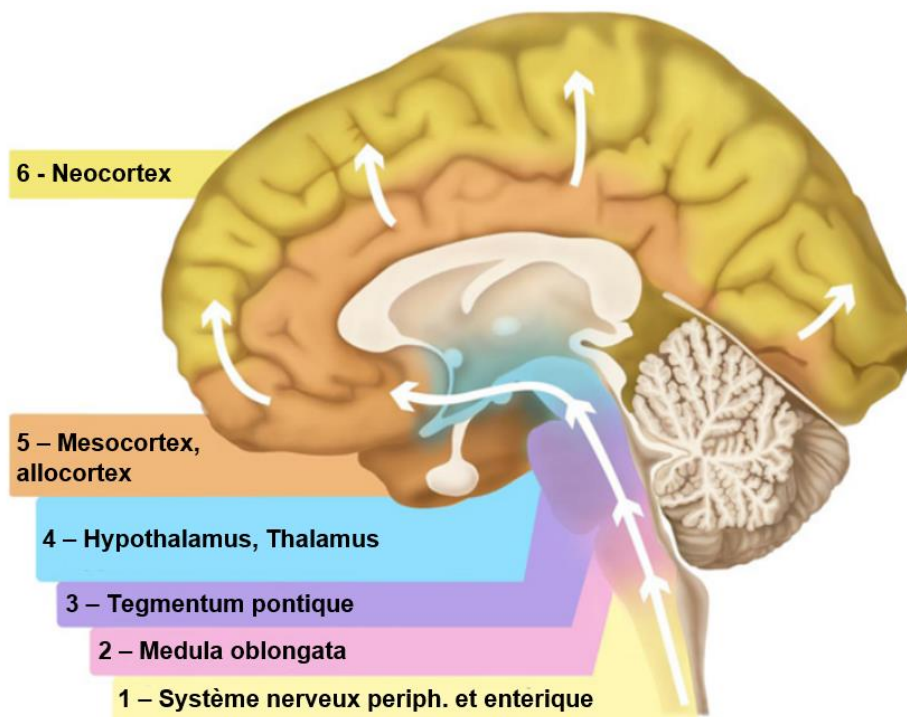


Figure 12 - Schéma de la progression de la MP au sein du cerveau selon le modèle de Braak (adapté de (Visanji, Brooks et al. 2013)).
Les dépôts d' α -synucléine se propagent temporellement et spatialement à partir du tronc cérébrale jusqu'aux régions sensibles comme la SN puis dans le néocortex cérébral.

Une étude réalisée par Braak *et collègues.*, sur 168 cerveaux de patients, a permis de décomposer la propagation des CL dans le SNC en 6 étapes distinctes (Braak, Ghebremedhin et al. 2004). On constate que les CL se forment tout d'abord dans le système nerveux périphérique avant de se propager vers le SNC. C'est au cours des étapes 3 et 4 que l'on constate l'apparition de CL dans la SN, ainsi que des lésions de celles-ci. A l'issue de l'étape 4 la phase symptomatique est enclenchée et les premières pertes de contrôle de l'activité motrice sont décelables chez le patient (Figure 12).

2.2 L' α -synucléine

L' α -synucléine est une protéine intracellulaire de 140 acides aminés non structurée à l'état natif (Burré, Vivona et al. 2013). Elle est présente en quantités abondantes au niveau des terminaux présynaptiques.

L' α -synucléine a été découverte en 1988 par Maroteaux *et al.* dans les synaptosomes des organes d'une raie électrique (Maroteaux, Campanelli et al. 1988). Elle fut localisée au niveau des terminaux présynaptiques ainsi que dans la membrane nucléaire. La localisation de la protéine au niveau des membranes synaptiques indique un rôle dans la libération de neurotransmetteurs. Néanmoins ce rôle n'est pas encore clairement établi. L' α -synucléine favoriserait le relargage de neurotransmetteurs (Cabin, Shimazu et al. 2002), mais pourrait aussi inhiber la fusion membranaire entre vésicules et membranes présynaptiques (DeWitt and Rhoades 2013). L' α -synucléine comporte trois parties distinctes (Figure 13).

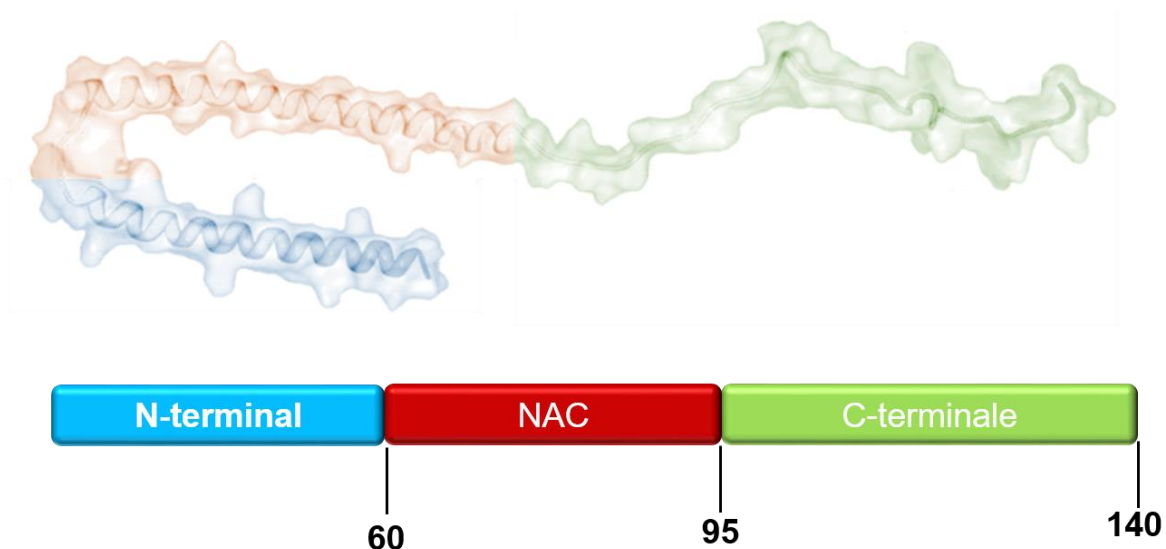


Figure 13 - Structure 3D de l' α -synucléine en interaction avec des micelles de SDS.

La partie N-terminale (résidus 1-60) contient une répétition de motif similaire à celle que l'on retrouve dans les apolipoprotéines. Cela confère à l' α -synucléine sa capacité à interagir avec les membranes (Lorenzen, Lemminger et al. 2014). L'interaction de la protéine avec des phospholipides d'une membrane va favoriser la structuration de cette partie N-terminale en hélice α . L'interaction membranaire est d'ailleurs définie comme capable de promouvoir l'agrégation de la protéine car elle induit une structuration partielle de celle-ci. Les protéines d' α -synucléine se trouvent rapprochées à la surface des membranes, l'interaction entre ces protéines est donc facilitée (Dikiy and Eliezer 2012). Nakamura *et collègues*. ont démontré que la structure de l' α -synucléine est plus « ouverte » lorsqu'elle est en interaction avec une membrane que lorsqu'elle est libre en solution (Nakamura, Nemani et al. 2008). On peut noter que les mutations ponctuelles du SNCA liées à la MP se situent dans cette partie de la protéine.

La partie NAC (résidus 61-95) est le centre hydrophobe de la protéine. Le NAC est le « Non-Amyloid beta component of Alzheimer's disease amyloid ». Cette partie de la protéine est responsable de sa capacité à « s'oligomériser », jusqu'à former des fibrilles (Iwai, Yoshimoto et al. 1995). La région NAC a la propriété de se structurer en feuillets β pendant cette formation de fibrilles. Il est intéressant de noter que les deux autres homologues de l' α -synucléine que sont la β -synucléine et la γ -synucléine (Clayton and George 1998) ne possèdent pas cette structure et de plus ne semblent pas être impliquées dans la MP (Lavedan, Buchholtz et al. 1998).

La partie C-terminale (résidus 96-140) est quant à elle chargée négativement. Elle n'adopte pas de structure en feuillet β ou en hélice α . Il semblerait que cette partie de la protéine joue le rôle d'un « cran de sécurité ». En interagissant avec la partie N-terminale ou le NAC, la partie C-terminale va empêcher les changements de structure de ces parties et maintenir une conformation stable et « fermée » de la protéine, défavorisant donc l'oligomérisation et la formation de fibrilles (Hong, Xiong et al. 2011).

De récents travaux réalisés par Bartels *et al.* suggèrent que l' α -synucléine s'organise majoritairement sous forme de tétramères stables (Bartels, Choi et al. 2011). Cette structuration quaternaire de la protéine préviendrait ainsi l'agrégation et la formation d'oligomères et de fibres. Dans ce cas, la déstabilisation de cette configuration provoquerait le désassemblage de ce tétramère en monomères et une exposition de la partie de la protéine qui lui confère sa capacité à s'agréger.

2.3 Agrégation et toxicité de l' α -synucléine

2.3.1 Agrégation de l' α -synucléine

L'agrégation de l' α -synucléine en fibrilles est un des facteurs importants de la MP. L'agrégation de l' α -synucléine passe par différentes étapes. A l'état initial, le monomère d' α -synucléine est non structuré (Figure 14a). Une structuration partielle de la partie N-terminal en hélice- α peut avoir lieu lors de l'interaction de la protéine avec la membrane présynaptique (Figure 14b). L'agrégation de l' α -synucléine peut conduire à la formation d'oligomères qui sont des polymères d' α -synucléine non-structurés. Ce sont des agrégats de protéine qui n'évoluent pas ensuite en fibrilles (Figure 14 e). Sous l'effet de l'environnement de la protéine ou de par une expression anormale de celle-ci, les monomères non structurés 'fermés' vont se retrouver 'ouverts' avec leur partie NAC pro-agrégative exposée (Figure 14c). Ceci va conduire à l'agrégation des différentes protéines d' α -synucléine qui vont interagir via leurs domaines NAC respectifs et se structurer partiellement en feuillet β au niveau de ce domaine (Figure 14d).

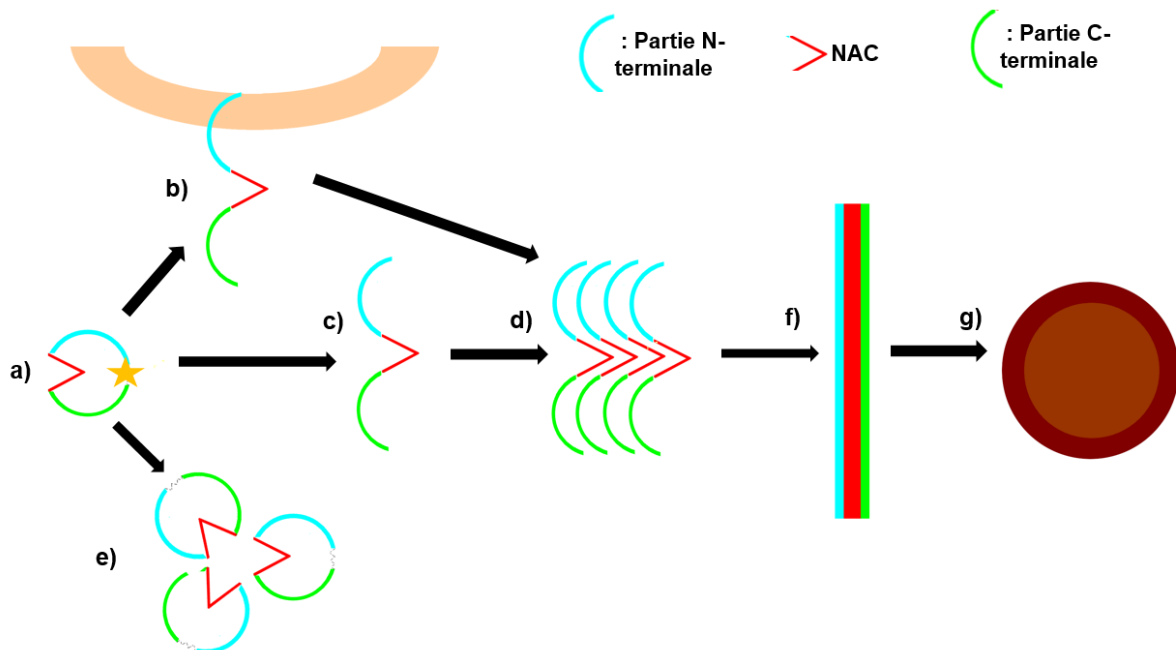


Figure 14 - Schéma décrivant les étapes de l'agrégation de l' α -synucléine

a) Monomère non structuré ; b) α -synucléine en interaction avec une membrane ; c) α -synucléine déstabilisée sous l'effet de l'environnement ou de mutations ; d) Agrégation de protéines d' α -synucléine ; e) Oligomère stable d' α -synucléine ; f) Fibrille d' α -synucléine ; g) Corps de Lewy.

Dans un premier temps, le processus d'agrégation conduit à la formation de deux types d'agrégats : des oligomères ou des protofibrilles (Conway, Lee et al. 2000). Les oligomères sont des polymères stables d' α -synucléine non-structurés (Figure 14e). Les protofibrilles quant à eux sont des agrégats structurés d' α -synucléine dont l'élongation donnera lieu à la formation des fibrilles. Ces protofibrilles peuvent adopter différentes structures et sont composés de 20 à 30 protéines (Lashuel, Petre et al. 2002). On peut distinguer des protofibrilles annulaires, tubulaires, ou sphériques. L'agrégation de l' α -synucléine va ensuite conduire à la structuration de la protéine en fibrilles dont la longueur varie de la centaine de nanomètre au micromètre, et dont l'épaisseur est autour de la dizaine de nanomètre (Figure 14f). Ces fibrilles sont ensuite chélatés sein des CL (Figure 14g). A noter que la formation de CL n'a jamais été constatée dans des conditions de laboratoire. Dans la suite de cette thèse, il sera fait distinction entre les deux termes : oligomères et protofibrilles.

Ce processus d'agrégation est inductible. En effet l'agrégation de l' α -synucléine est un phénomène qui est sensible à l'environnement dans lequel se trouve la protéine, ainsi qu'à certaines mutations. Aussi, des études ont démontré que le stress oxydant ou des modifications post-translacionnelles telles que la nitration (Gao, Kotzbauer et al. 2008) ou la phosphorylation (Kahle, Neumann et al. 2002) de la protéine peuvent favoriser son agrégation.

L'impact de l'agrégation de l' α -synucléine sur sa capacité à provoquer la perte des neurones dopaminergiques est connue (Breydo, Wu et al. 2012), cependant la toxicité des différentes formes d' α -synucléine agrégée est sujette à débat. Il n'est pas encore clairement établi laquelle de ces formes est la plus toxique. Actuellement, il est admis que la formation des CL au sein des neurones serait une forme de détoxification de la cellule, chélatant les agrégats toxiques d' α -synucléine (Lashuel, Petre et al. 2002). De même, il s'avère que les fibrilles ne sont pas, ou peu, toxiques. Pour exemple, la synphilin-1 est une protéine avec la capacité intéressante de réduire la neurodégénération tout en favorisant la formation de fibrilles d' α -synucléine (Smith, Liu et al. 2010).

Le consensus actuel désigne les protofibrilles comme étant les agrégats d' α -synucléine les plus toxiques (Volles and Lansbury 2002, Lashuel, Overk et al. 2013). Conway *et al.* (Conway, Lee et al. 2000, Nielsen, Macchi et al. 2013) mettent en évidence que la mutation pathogène du gène SNCA, A30P, induit la formation d'agrégats toxiques tandis qu'elle prévient la formation de fibrilles matures. Une autre étude indique que ce serait des protofibrilles qui seraient les formes agrégées les plus toxiques (Winner, Jappelli et al. 2011).

Deux types de variant d' α -synucléine y sont étudiés, les uns favorisent la formation de protofibrilles et les autres favorisent la formation de fibrilles. Winner et ses collègues démontrent que l'injection de variants pro-*protofibrilles* dans la SN de rats conduits à la formation de protofibrilles annulaires et à une à forte réduction de nombre de neurone dopaminergiques, contrairement à l'injection des variants *pro-fibrilles*.

Quoiqu'il en soit, l'existence de liens entre l'agrégation de la protéine et la maladie de Parkinson est indéniable bien que la nature de ces liens ne soit pas encore éclaircie. L'identification de composés capable d'interférer avec ce phénomène d'agrégation est une voie de recherche qui pourrait mener au design de composés à intérêt thérapeutique contre la MP (Rochet and Liu 2009).

2.3.2 Perméabilisation des membranes

Plusieurs études ont démontré que l' α -synucléine peut interagir avec les lipides (Davidson, Jonas et al. 1998). En effet, sa structure lui confère des propriétés amphiphathiques. L'extrémité N-terminale de l' α -synucléine présente une répétition (imparfaite) d'une série de 11 acides aminés au sein de laquelle un motif est conservé (KTKEG) (Bussell Jr and Eliezer 2003). L' α -synucléine est donc une protéine capable d'interagir avec les membranes plasmique ainsi qu'avec les membranes mitochondriales (Guardia-Laguarta, Area-Gomez et al. 2014). De plus, Eliezer *et ses collègues* ont mis en évidence que l'interaction de la protéine avec les membrane favorise son agrégation (Eliezer, Kutluay et al. 2001). Cela pourrait être causé par l'ouverture de la protéine lorsqu'elle est en interaction avec ces membranes (Nakamura, Nemani et al. 2008). Comme décrit précédemment, l' α -synucléine forme des protofibrilles annulaires (Pountney, Lowe et al. 2004). Ces protofibrilles sont capables d'interagir avec les membranes plasmiques pour former des pores, causant ainsi la dégénérescence des cellules (Volles and Lansbury 2002).

La capacité de l' α -synucléine à perméabiliser ainsi la membrane peut provoquer la mort cellulaire en permettant la diffusion d'ions Na^+ ou Ca^{2+} pouvant être toxiques pour la cellule. La perméabilisation membranaire permet aussi la diffusion de constituant cellulaires tels que le cytochrome C capable d'induire l'apoptose une fois dans le milieu extra cellulaire. De plus, la perméabilisation des membranes mitochondriales conduit quant à elle à une dépolarisation ouvrant la voie au stress oxydant résultant de l'inactivation de la chaîne respiratoire. (Nakamura, Nemani et al. 2011).

2.3.3 Induction de la neuro-inflammation

Rappelons que l'inflammation est un des facteurs participant à la dégénérescence des neurones dopaminergiques lors de la MP (Gao, Jiang et al. 2002). L'activation des microglies va conduire à la production de facteurs neurotoxiques tels que des ROS et des médiateurs de l'inflammation (Liu and Hong 2003).

Des études ont observé la présence de microglies activées autour des CL. En effet, Zhang *et al.* ont mis en évidence que la phagocytose des agrégats d' α -synucléine induisait l'activation des microglies (Zhang, Wang et al. 2005). L'activation de cascades inflammatoires est l'un des leviers de la neurotoxicité induite par les agrégats d' α -synucléine. Elle va s'auto-amplifier sous l'effet des mécanismes eux-mêmes enclenchés par l'inflammation (Block, Zecca et al. 2007). En effet les ROS produits vont induire l'agrégation de l' α -synucléine et sous sa forme agrégée la protéine va conduire à l'activation des microglies (Figure 3). L'inflammation est une cause ainsi qu'une conséquence de la MP.

2.4 α -synucléine et polyphénols

L'agrégation de l' α -synucléine est un facteur pathogène responsable de la MP. La recherche d'agents thérapeutiques pouvant entraver cette pathologie passe donc par l'identification de composés aptes à inhiber et inverser l'agrégation de l' α -synucléine.

Plusieurs études ont mis en évidence que des polyphénols comme la baicaleine, l'épigallocatechine gallate (EGCG) ou encore le resvératrol ont la capacité de prévenir l'agrégation de cette protéine (Masuda, Suzuki et al. 2006, Bieschke, Russ et al. 2010, Meng, Munishkina et al. 2010, Caruana, Högen et al. 2011). Les propriétés anti-agrégatives de ces polyphénols sont corrélées avec des observations de leur effet neuroprotecteur *in vitro* sur de cellules animales (Griffioen, Duhamel et al. 2006, Masuda, Suzuki et al. 2006, Bieschke, Russ et al. 2010). Certaines de ces molécules sont d'ailleurs capables de passer la BHE (Janle, Lila et al. 2010). La recherche de composés phénoliques nouveaux et la caractérisation de leurs propriété anti-agrégatives et neuroprotectrices à l'encontre de l' α -synucléine est donc une voie pour le design d'agents thérapeutiques capables d'inverser la progression de la MP.

3 Polyphénols de la vigne

Les polyphénols regroupent un ensemble de molécules dont la structure comprend un ou plusieurs cycles aromatiques présentant un ou plusieurs groupements hydroxyles (Figure 15). A l'heure actuelle on dénombre plusieurs milliers de ces composés dans le règne végétal. Ces molécules naturelles se retrouvent dans notre alimentation et seraient responsables de nombreux bienfaits. En France, la consommation moyenne de polyphénols apportés par l'alimentation est estimée à 1g/jour/personne (Brat 2006). Ainsi les fruits et légumes, les céréales, les légumes secs, le vin, le thé, le café, ou encore les jus de fruits sont des sources de ces molécules. Les polyphénols présentent une variété d'activités biologiques. Ils agissent comme antioxydants, cardio-protecteurs, anti-inflammatoires ou encore anti-microbiens (Sato, Ramarathnam et al. 1996, Sato, Maulik et al. 2002, Baydar, Sagdic et al. 2006, Brat, Georgé et al. 2006, Mantena, Baliga et al. 2006, Santangelo, Vari et al. 2007).

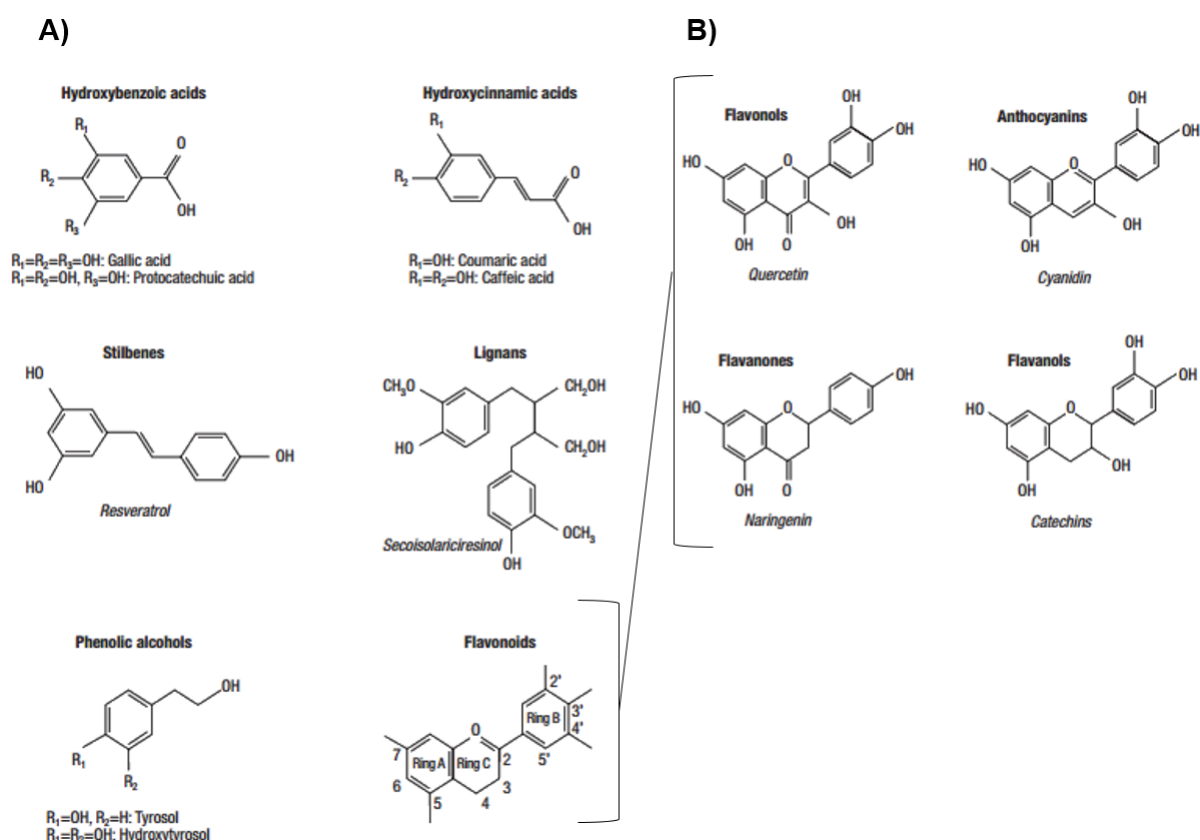


Figure 15 - Structures chimiques des polyphénols (D'Archivio, Filesi et al. 2007).

A) Structure des différentes familles de polyphénols. B) Structure des polyphénols de la famille des flavonoïdes.

La structure des polyphénols varie en fonction du nombre de cycles phénols et des groupements chimiques qui y sont rattachés (D'Archivio, Filesi et al. 2007). Il est possible de

classifier ces molécules en 2 grandes familles (Figure 15) : les flavonoïdes (flavonols, anthocyanes, flavanols et flavanones) et les non-flavonoïdes (acides phénoliques, lignanes et stilbènes).

3.1 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes partagent une structure commune en C6-C3-C6 correspondant à deux noyaux benzènes reliés par 3 carbones successifs. Les flavonoïdes représentent plus de 10000 molécules à ce jour et sont partagée en quatre grands sous-groupes : flavonols, flavanones, anthocyanes et flavanols (Mouradov and Spangenberg 2014).

Anthocyanes	
mg/kg	
Myrtilles	1635,2
Canneberge	918,8
Cerises	801,9
Chou rouge	729,8
Framboise	386,8
Fraises	336,3
Haricots	280
Poires	121,8
Prunes	120,2
Bananes	73,9
mg/L	
Vins rouges (jeunes)	400

Flavanones	
mg/kg	
Citron	498,10
Oranges	425,70
Tangerines	179,60
Tomates	6,80
Jus de citron	239,90
Jus de baie	192,20
Jus d'orange	136,20
Vins rouges	8

Flavanols	
mg/kg	
Myrtilles	517,1
Pêches	91,9
Pommes	81,1
Poires	67,9
Bananes	61,2
Fraises	46,4
Bières	24,8
mg/L	
Thé noir	1152,5
Jus de pomme	59,6
Vins rouges	150
Vins blancs	20

Flavonols	
mg/kg	
Oignons	270,70
Pommes	59,60
Lettues	16,30
Bières	8,60
Tomates	8,20
Café	1,00
mg/L	
Thé noir	37,50
Vins rouges	100

Tableau 2 - Teneurs en flavonoïdes dans différentes sources alimentaires
http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/80400525/Data/Flav/Flav_R03.pdf
 Adapté de “Sources of Flavonoids in the U.S. Diet Using USDA’s Updated Database on the Flavonoid Content of Selected Foods.” Haytowitz, D.B. *et al.*

3.1.1 Les flavonols

Les flavonols ont une double liaison entre les carbones C-2 et C-3 ainsi qu'un groupe hydroxyle au niveau du C-3 (Figure 15). Ces molécules s'accumulent dans les parties externes et aériennes des plantes car leur biosynthèse est induite par la lumière. C'est pourquoi la concentration en flavonols est très hétérogène dans une plante, jusqu'à différer entre 2 parties d'un même fruit (D'Archivio, Filesì et al. 2007). Ils sont naturellement présents dans une grande diversité de sources alimentaires. La quercétine (et ses hexosides), la myricétine, l'isorhamnétine ou encore le kaempférol sont les plus répandus (D'Archivio, Filesì et al. 2007). A titre indicatif le tableau 2 donne les teneurs en flavonoïdes, dont les flavonols, dans différents aliments. En particulier, les vins rouges en contiennent jusqu'à 100 mg par litre (Waterhouse 2002). Dans la vigne, les flavonols les plus représentés sont les dérivés de la myricétine et de la quercétine (Hilbert, Temsamani et al. 2015).

3.1.2 Les anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments naturels présents dans de nombreux fruits et légumes (fruits rouges, raisin, orange sanguine, aubergine, pomme de terre vitelotte, prune...). Elles sont présentes sous forme d'hétérosides formés par la condensation d'un aglycone avec un ose. Ce sont des pigments solubles dans l'eau. La teneur d'un fruit en anthocyanes est généralement liée à l'intensité de sa coloration rouge. La teneur en anthocyanes de certains fruits comme les myrtilles avoisinent les 1700 mg/kg (Tableau 2). Dans les vins rouges la teneur en anthocyanes varie au cours du temps. Les vins contiennent près de 90 mg/L d'anthocyanes pour les vins vieux, et 400 mg/L pour les vins jeunes (Waterhouse 2002). Ces flavonoïdes sont instables au cours de la maturation du vin et se complexent aux tannins pour former des pigments stables responsables de la couleur du vin.

3.1.3 Les flavanols

Les flavanols ou flavan-3-ol sont des flavonoïdes dont la structure est basée sur le 2-phényl-3-chromanol (Figure 15B). Ce sont les seuls flavonoïdes dont on ne connaît pas de forme

hétéroside dans notre alimentation. La polymérisation des flavanols conduit à la formation de structures oligomères appelées proanthocyanidols ou tanins condensés.

Les teneurs en flavanols sont autour de 250 mg/kg dans les abricots et les cerises (Tableau 2). Dans le vin, leur teneur varie de près de 20 mg/L dans les vins blanc à environ 150 mg/L dans les vins rouges. La teneur en polymères est plus difficile à apprécier du fait de la grande variété de molécules existantes. Les degrés de polymérisation allant de 4 jusqu'à 11. Ces polyphénols sont responsables de l'astringence des fruits et boissons qui les contiennent (D'Archivio, Filesi et al. 2007).

3.1.4 Les flavanones

Les flavanones présentent un oxygène sur le carbone C-4. Les molécules de ce sous-groupe sont souvent glycosylées par un disaccharide sur le carbone C-7 (Figure 15B). On en retrouve dans les citrons, les tomates, les raisins, les oranges ainsi que dans certaines herbes aromatiques comme la menthe (D'Archivio, Filesi et al. 2007). Leur concentration dans le vin est faible, le flavanone principale dans les vins rouges est la naringine à une teneur de 8 mg/L (Jandera, Škeříková et al. 2005) (Tableau 2).

3.2 Les non-flavonoïdes

La famille des composés phénoliques non-flavonoïdes de la vigne peut être décomposée en trois sous-groupes : les lignanes, les acides phénoliques et les stilbènes. Le tableau 3 présente les teneurs en acides phénoliques et stilbènes dans quelques sources alimentaires.

Acides Phénols		Stilbènes	
mg/kg		mg/kg	
Mûres	80–270	Myrtilles rouges	30
Framboise	60–100	Canneberges	19,2
Fraises	20–90	Groseilles	15,7
Mures	2000–2200	Fraises	3,5
Kiwis	600–1000	Raisins noirs	3,3
Cerises	180–1150	Raisins blancs	2,9
Prunes	140–1150	Chocolat noir	1,4
Aubergines	600–660	Pistaches	1,1
Pommes	50–600	Lentilles	0,9
Poires	15–600	Cacahuètes	0,8
Artichauts	450	mg/L	
Patates	100–190	Vins rouges	35,9
Farine de maïs	310	Vins blancs	7,9
Cidre	10–500	Vins rosés	4
Pommes	350–1750		
mg/L			
Vins rouges	160		
Vins blancs	150		

Tableau 3 - Teneurs en polyphénols non-flavonoïdes dans différentes sources alimentaires.

Les teneurs en acides phénols sont données d'après (Manach, Scalbert et al. 2004). Les teneurs en stilbènes sont issues de la base de données « phenol-explorer » (<http://phenol-explorer.eu>).

3.2.1 Les acides phénoliques

Un acide phénolique est une molécule possédant un cycle phénolique lié à un groupement carboxyle. Ces composés sont présents dans de nombreuses sources alimentaires (Tableau 3). Il existe principalement deux formes d'acides phénoliques. On distingue les dérivés de l'acide benzoïque et ceux de l'acide cinnamique (Figure 15A). Peu de plantes comestibles contiennent des dérivés de l'acide benzoïque. Ils sont présents dans certains fruits rouges : mûres (2 g/kg), framboise (100 mg/kg) etc. Les dérivés de l'acide cinnamique sont bien plus abondant dans notre alimentation. L'acide caféique est dans de nombreux fruits et légumes le composé phénolique majoritaire. On en retrouve jusqu'à 2g/kg chez la myrtille et jusqu'à 1 g/kg chez le kiwis (D'Archivio, Filesi et al. 2007). Les acides phénoliques sont présents dans les vins blancs à près de 150 mg/L et dans les vins rouges jeune à 160 mg/mL (Waterhouse 2002).

3.2.2 Les lignanes

Les lignanes sont le produit de la condensation de deux phénylpropane (Figure 15A). Ils sont majoritairement présents sous leur forme aglycone. Ce sont des polyphénols encore peu étudiés mais ils suscitent un intérêt nouveau depuis la caractérisation de leur propriétés bénéfiques dans les chimiothérapies et ainsi que d'autres bienfaits (Saleem, Kim et al. 2005). Leur principale et presque unique source dans le règne végétal est le lin, avec une teneur en secoisolariciresinol de près de 4 g/kg (D'Archivio, Filesi et al. 2007).

3.2.3 Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés non-flavonoïdes dont la structure est caractérisée par deux cycles benzène reliés par un groupe isopropylène (structure en C6-C2-C6) (Figure 15A). Ils sont synthétisés par l'intermédiaire de la voie des phénylpropanoïdes (Figure 16). La brique de base des stilbènes est le resvératrol (3,5,4'-trihydroxy-stilbene) sur lequel vont pouvoir se substituer différents groupes : groupements hydroxyle, méthoxyles ou glucosides. Le couplage oxydant entre monomères de resvératrol et d'autres unités monomériques de stilbènes donne naissance à des oligomères complexes (Figure 17).

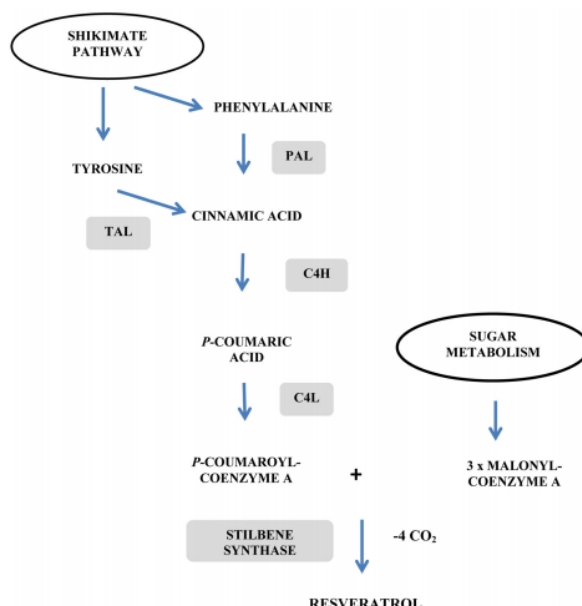


Figure 16 - Biosynthèse du resvératrol (Jeandet, Clément et al. 2013).
(PAL : phénylalanine ammonia-lyase ; TAL : tyrosine ammonia-lyase ; C4H : cinnamate-4-hydroxylase ; C4L : coumarate coenzyme A ligase ; STS : stilbène synthase).

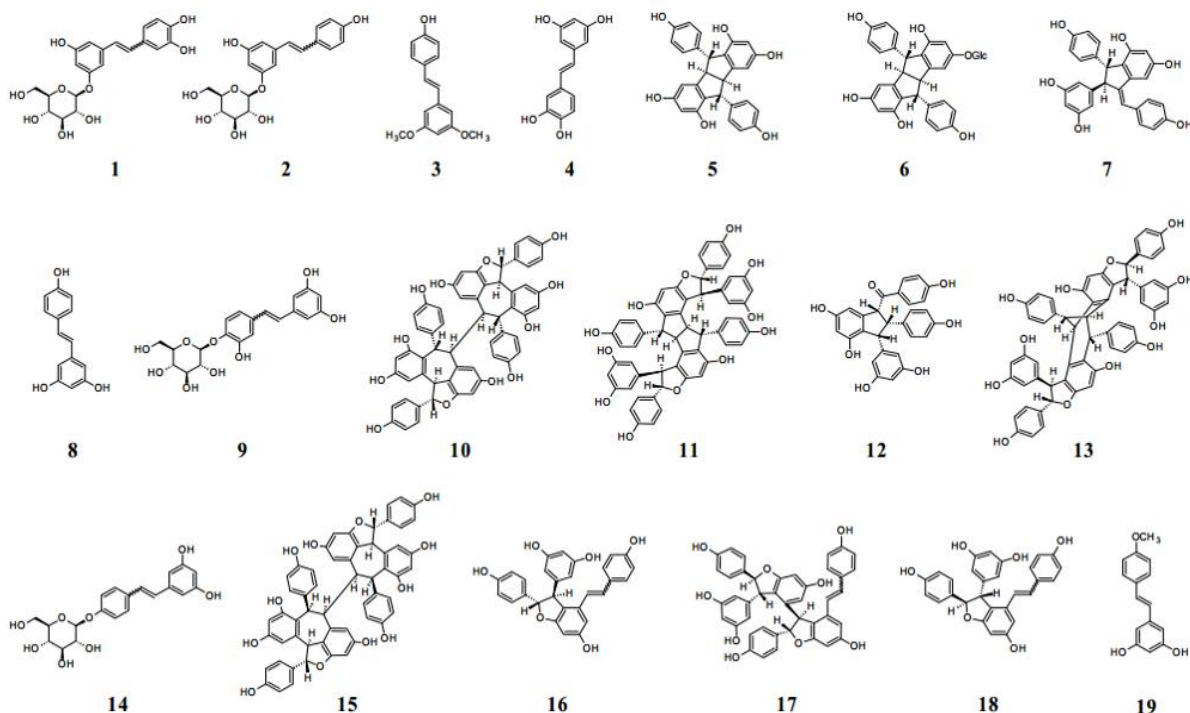


Figure 17 - Structures des stilbènes de la vigne.

(1) Astringine; (2) Picéide; (3) Ptérostilbène; (4) Picéatannol; (5) Pallidol; (6) Pallidol-3-*O*-glucoside; (7) Parthénocissine A; (8) *trans*-resvératrol; (9) Resvératroloside; (10) Hopéaphénol; (11) Ampélopsine H; (12) Caraphénol B; (13) Vaticanol C ; (14) Resvératrol-4'-*O*- β -D-glucopyranoside; (15) Isohopeaphénol; (16) ϵ -viniférine; (17) Miyabénol C; (18) δ -viniférine; (19) *trans*-resvératrol-4'- méthyle éther (Flamini, Mattivi et al. 2013).

3.3 Propriétés des stilbènes

3.3.1 Sources

Les stilbènes sont des métabolites secondaires des plantes synthétisés en cas d'exposition à un stress extérieur (Chong, Poutaraud et al. 2009). Il a été démontré que ce sont des phytoalexines dont la production est induite lors l'infection de la plante (Jeandet, Douillet-Breuil et al. 2002). On a pu observer que les espèces de *Vitis* les plus résistantes étaient celles qui produisaient le plus de stilbènes en réaction aux pathogènes biologiques (Pezet, Gindro et al. 2004).

Le premier stilbène à avoir été isolé fut le resvératrol dans les racines de vérâtre blanc en 1940 par Takaoka. Comme le montre le tableau 3, les stilbènes sont présent dans une large variété de sources alimentaires comme les fruits rouges, les pistaches ou les cacahuètes (Sebastià,

Montoro et al. 2012). Cependant, le vin représente la principale source alimentaire de stilbènes (Zamora-Ros, Andres-Lacueva et al. 2008). Le resvératrol est présent jusqu'à 2 mg/L dans les vins rouges (Burns, Yokota et al. 2002). Son glucoside, le picéide, est présent en quantités plus importantes. La plus haute concentration en picéide caractérisée dans un vin rouge est de 30 mg/L (Stervbo, Vang et al. 2007). Le vin contient également des oligomères de resvératrol (Vitrac, Bornet et al. 2005, Moss, Mao et al. 2013). Enfin, les sarments de vigne sont l'une des principales sources de stilbènes complexes (Pawlus, Waffo-Téguo et al. 2012).

3.3.2 Activités biologiques

Le resvératrol a montré un grand nombre de bienfaits pour la santé durant les deux dernières décennies (Guerrero, García-Parrilla et al. 2009). Le resvératrol est de loin le stilbène le plus étudié. Les effets biologiques de cette molécule sont nombreux. Un résumé non exhaustif de ses propriétés est présenté dans le tableau 4. A contrario, les autres stilbènes et en particulier les oligomères sont peu étudiés. Cependant, de récents travaux ont démontré le potentiel biologique de ces composés (Yao, Lin et al. 2012, Papastamoulis, Bisson et al. 2015).

Effet	Publication
Restriction Calorique	Baur 2006
Amélioration élasticité aortique	Pearson 2008
Amélioration coordination motrice	Pearson 2008
Preservation densité osseuse	Pearson 2008
Relargage de cellules souches	Chen 2011
Protection des mitochondries	Gerhardt 2006
Lypolyse	Picard 2004
Inhibition des médiateurs de l'inflammation	Liu 2015
Reduction de la glycémie	Marchal 2012
Inhibition vascularisation cellules cancéreuse	Tseng 2004
Vasorelaxation	Shen 2013
Activité antioxydante	Frombaum 2012

Tableau 4 - Activités biologiques du resvératrol.

Le resvératrol est le stilbène dont les activités biologiques sont les plus documentées. Ce tableau en dresse une liste non-exhaustive.

3.3.2.1 Activités anticancéreuses

Les stilbènes sont des agents chimio-préventifs pouvant lutter contre la prolifération de plusieurs types de cellules cancéreuses. Des études ont mis en évidence que le resvératrol et ses dérivés, tels que l' ϵ - et l' α -viniférine, le vaticanol B et C, l'hopéaphénol, le ptérostilbène, le picéatannol, le pallidol ou encore l'ampélopsine A préviennent la prolifération de cellules cancéreuses de la peau, de la glande maxillaire, du colon, du sang ou encore de tumeurs murines (Ohyama, Tanaka et al. 1999, Kimura, Baba et al. 2000, Wiedner, Prokop et al. 2001, Billard, Izard et al. 2002, Ito, Akao et al. 2003, Mishima, Matsumoto et al. 2003, Chowdhury, Kishino et al. 2005, Tolomeo, Grimaudo et al. 2005, Chalal, Delmas et al. 2014). L' ϵ -viniférine est aussi un inhibiteur des enzymes cytochrome p450, responsables de l'oxydation, de la métabolisation et de la bio-activation des agents cancérigènes (Piver, Berthou et al. 2003).

Une autre activité des stilbènes liée à la chimio-prévention est l'inhibition de l'apparition de lésion préneoplastiques dans des cultures de glandes mammaires murines, un modèle permettant l'identification d'agent chimio-préventifs (Mehta, Mehta et al. 1997). Une étude de Waffo-Teguo *et collègues* a mis en évidence que le resvératrol, l'astringine et le picéatannol induisent une inhibition significative de ces lésions induites par le 7,12-dimethylbenz(a)anthracène, un immunosuppresseur initiateur de tumeurs (Waffo-Tégou, Hawthorne et al. 2001). Le picéatannol est aussi un inhibiteur des tyrosines kinases (Geahlen and McLaughlin 1989), des protéines dont la surexpression est impliquée dans les voies de signalisation de facteurs de croissance favorisant la prolifération des cellules cancéreuses. Ce stilbène induit l'apoptose sur des cellules cancéreuses humaine (Ashikawa, Majumdar et al. 2002), tout comme le ptérostilbène sur les cellules leucémiques (Tolomeo, Grimaudo et al. 2005), et présente une activité anti-métastatique liée à sa capacité à inhiber l'angiogenèse (Kimura, Baba et al. 2000).

3.3.2.2 Maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont principalement causées par l'athérosclérose. Le stress oxydant est un des facteurs impliqués dans l'athérosclérose. En effet les ROS et RNS induisent l'oxydation des LDL. Sous cette forme oxydée, les LDL sont internalisés par endocytose non régulée au sein des macrophages. Cela va conduire à la formation de cellules

spumeuses riches en cholestérol. Ce type de cellules induit sur les artères la formation d'athéromes, responsables des maladies cardiovasculaires (Madamanchi, Vendrov et al. 2005) (Figure 18).

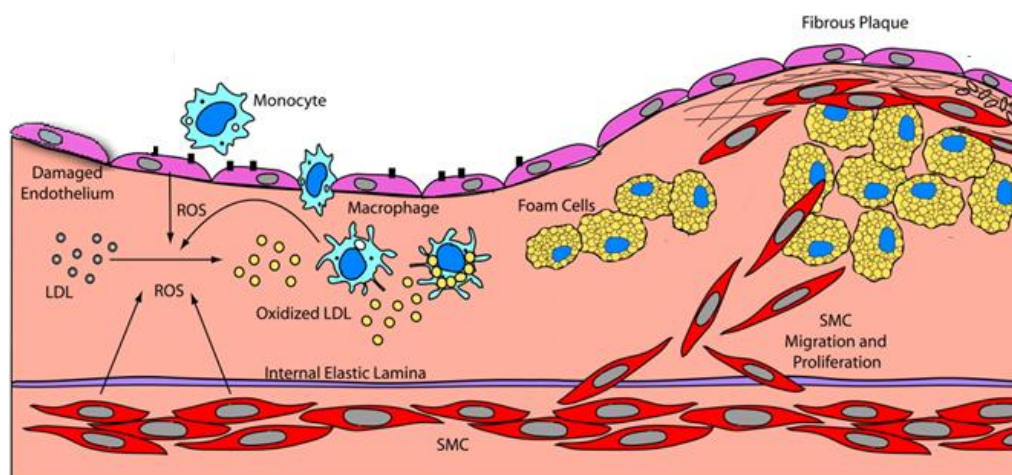


Figure 18 - Développement d'un athérome d'après (Madamanchi, Vendrov et al. 2005).
Les ROS oxydent les LDL dans l'espace subendothélial. Cette oxydation induit la formation des cellules spumeuses induisant la plaque d'athérome. La rupture de cette plaque peut causer une thrombose et une occlusion du vaisseau sanguin.

Les propriétés anti-oxydantes de certains stilbènes peuvent donc être associées à leur capacité à prévenir ce genre de maladies. Le resvératrol, l'astringine ou encore le picéatannol sont des antioxydants plus efficaces que le Trolox (antioxydant de référence, analogue de la vitamine E) pour l'inhibition de la peroxydation de LDL (Waffo Tegu, Fauconneau et al. 1998). De plus certains oligomères, comme la scirpusine A, le quadrangularine A, la parthénocissine A, les laetevirenols A et B, le chunganénol, l' ϵ -viniférine et la vitisine A, ont démontré une activité anti-oxydante supérieure à celle du resvératrol (He and Yan 2013).

La formation d'un athérome peut conduire à l'agrégation locale des plaquettes jusqu'à l'obstruction de l'artère et la formation d'une thrombose. Les stilbènes pourraient également inhiber ce mécanisme. En effet, le vitisine A, le resvératrol, la desoxyrhapontigénine, la rhapontigénine et le picéatannol inhibent l'agrégation plaquettaire induite par l'acide arachidonique (Ko, Lee et al. 1999). Cette inhibition passerait par l'inhibition de la cyclo-oxygénase-1 (COX-1) et donc du métabolisme de l'acide arachidonique en thromboxanes, des cytokines responsables de la vasoconstriction et de l'agrégation des plaquettes.

Par ailleurs, Hung et ses collègues ont démontré que l'astringine a une activité cardioprotectrice en inhibant la fibrillation ventriculaire suite à l'ischémie/reperfusion

provoqué par l'occlusion d'une artère (Hung, Chen et al. 2001). L'effet protecteur du stilbène serait dû à sa capacité à accroître la quantité d'oxyde nitrique vasodilatateur dans le sang.

3.3.2.3 Effets neuroprotecteurs

L'une des voies empruntées par la recherche médicale pour apporter des solutions thérapeutiques aux maladies neurodégénératives est la recherche de composés capable de traiter et de prévenir les dommages cérébraux (Bhullar and Rupasinghe 2013). Les stilbènes ont démontré d'intéressantes activités neuroprotectrices. Néanmoins, la majorité des études sur le caractère neuroprotecteur des stilbènes s'est concentrée sur le resvératrol.

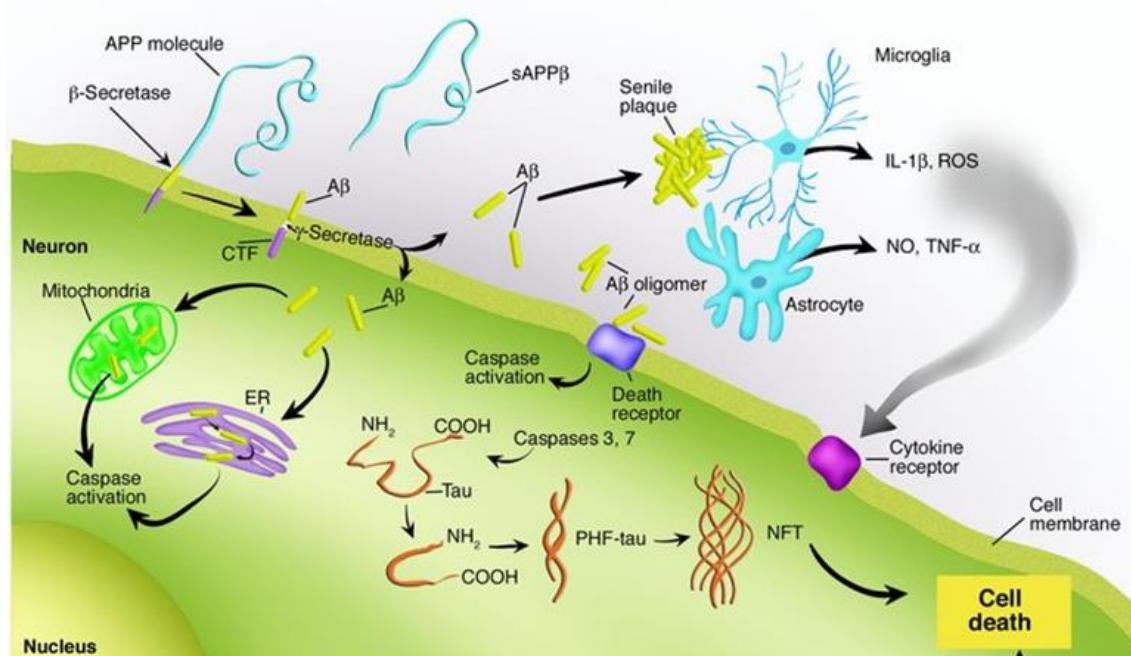


Figure 19 - Événements de la cascade amyloïde (d'après (Dickson 2004)).

Le peptide β A est généré à partir de l'APP. Il forme ensuite des agrégats extracellulaires qui conduisent aux plaques séniles. Les caspases peuvent être activées par les récepteurs à cytokines ou par les dommages causés aux mitochondries et au réticulum endoplasmique. Les dépôts amyloïdes activent les microglies et induisent la neuroinflammation

La maladie d'Alzheimer est la principale maladie neurodégénérative. Elle est caractérisée par l'accumulation de la protéine tau et par la production excessive de peptide Beta Amyloïde (β A). Leur accumulation en excès conduit à un dysfonctionnement cellulaire (Hardy and Selkoe 2002). Le β A est le produit du clivage protéolytique séquentiel de la protéine transmembranaire APP (Amyloid Protein Precursor) par deux enzymes : la β -secrétase et la γ -secrétase. L'agrégation de ce peptide en fibres insolubles conduit à l'apparition de plaques

amyloïdes, qu'on appelle aussi « plaques séniles » (Murphy and LeVine 2010). Cette agrégation va provoquer un stress oxydant et enclencher un processus inflammatoire, en plus du dysfonctionnement des neurones touchés. C'est une cascade d'évènements qui va conduire à la mort des neurones (Figure 19).

Le resvératrol est capable d'inhiber l'agrégation du peptide β A (Rivière, Richard et al. 2008). Ce stilbène peut aussi moduler l'activation du protéasome pour réduire la sécrétion du β A (Marambaud, Zhao et al. 2005). Le resvératrol s'est avéré capable d'interférer dans la cascade amyloïde. Il freine l'accumulation des ROS, protégeant ainsi les cellules PC12 contre la mort induite par le β A (Jang and Surh 2003). Par ailleurs, des dérivés du resvératrol ont démontré des activités neuroprotectrices envers la maladie d'Alzheimer. Le picéide, l'ampélopsine A, l' ϵ -viniférine glucoside et la scirpusine A ont montré une activité supérieure à la curcumine, un inhibiteur de référence, pour ce qui est de l'inhibition de l'agrégation du β A (Rivière, Richard et al. 2008). Il s'est avéré que certains dimères du resvératrol comme l' ϵ -viniférine glucoside et la scirpusine A sont plus actifs que le resvératrol (Rivière, Papastamoulis et al. 2010). L' ϵ -viniférine glucoside est aussi capable de prévenir la toxicité induite par le β A sur des lignées cellulaires PC12 (Richard, Poupard et al. 2011). Une étude clinique a été réalisée en 2014 pour évaluer l'intérêt thérapeutique du resvératrol sur la maladie d'Alzheimer. C'est une étude clinique de phase 2 conduites aux Etats-Unis par le National Institute of Aging sous le titre « Resvératrol for Alzheimer's disease » (référence NCT01504854). Ses résultats n'ont pas encore été publiés à ce jour.

Les patients atteints de maladie de Huntington souffrent de manque de coordination fine des mouvements musculaires, de troubles de la personnalité ainsi que de démence. Cette maladie neurodégénérative est caractérisée par la dégénération des neurones au niveau du striatum. La dégénération des neurones est causée par une forme mutante de la protéine huntingtine. La polyglutamination de la protéine va conduire à son agrégation. Les agrégats ainsi formés vont perturber la mobilité des vésicules cellulaire et des mitochondries, ce qui va amplifier l'émission de ROS et causer la mort des neurones (Solans, Zambrano et al. 2006). Dans cette étude, Solans et ses collègues développe un modèle de levure de la maladie de Huntington. Ils démontrent que de par son activité anti-oxydante, le resvératrol inhibe les dommages induits par les ROS produits par les mitochondries rendues déficientes suite à l'exposition à un fragment toxique de la protéine d'huntingtine. Les symptômes de Huntington sont aussi dus à une déficience des neurones du striatum qui serait causée par la diminution du transport de vésicules contenant le BDNF (un facteur neurotrophique du cerveau) depuis le cortex vers le

striatum (Strand, Baquet et al. 2007), cette diminution du trafic vésiculaire est l'une des conséquences de l'action de la huntingtine mutante. Ce facteur est nécessaire à l'activation de ERK, une protéine en amont d'une cascade permettant la survie cellulaire (Lu and Xu 2006). Maher et *collègues* (Maher, Dargusch et al. 2011) ont pu démontrer que le resvératrol peut pallier à la baisse de BDNF en activant la cascade ERK et en rétablissant le niveau de survie cellulaire.

L'inflammation est un événement pivot dans le développement des maladies neurodégénératives (Amor, Puentes et al. 2010). L'inhibition des facteurs pro-inflammatoires est une voie pour entraver ces pathologies. Les stilbènes sont des molécules capables d'exercer cet effet. Il a été constaté que les médiateurs chimiques de l'inflammation sont inhibés par le resvératrol dans les microglies. En effet le resvératrol module les enzymes telles que les lipo-oxygénases et COX-1 et inhibe la NO inducible (iNOS) et la production de cytokines ainsi que de facteurs de la transcription NF- κ B et AP-1 (Zhang, Liu et al. 2010). De plus, des travaux réalisés au GESVAB ont montré que le resvératrol, le picéatannol, l' ϵ -viniférine et les vitisines A ou B sont capables d'inhiber la production d'un marqueur de l'inflammation, l'oxyde nitrique (Nassra, Krisa et al. 2013). Ces résultats mettent en évidence l'effet protecteur des stilbènes envers l'inflammation induite par les polysaccharides dans des cellules microgliales.

3.3.2.4 Biodisponibilité

Pendant longtemps, des études sur les activités biologiques du resvératrol ont été menées sans connaître la biodisponibilité de ce composé. Ce n'est qu'à partir des années 2000 que les chercheurs commencent réellement à s'intéresser à la biodisponibilité du resvératrol. Les travaux, réalisés par Bertelli et son équipe sur des rats, montrent le resvératrol était rapidement absorbé, avec l'apparition d'un pic plasmatique à 30 minutes (Bertelli, Bertelli et al. 1998). L'étude de la biodisponibilité du resvératrol marqué au Carbone 14 a mis en évidence la présence du stilbène dans les poumons, reins, foies, colons, cœurs, testicules et cerveaux de souris (Vitrac, Desmoulière et al. 2003). Par la suite, de nombreuses études ont été réalisées sur la biodisponibilité du resvératrol *in vitro*, chez l'animal, mais également chez l'Homme. Boocook et ses collègues (Boocook, Patel et al. 2007) ont montré que le resvératrol se retrouve métabolisé dans le plasma et l'urine de volontaires ayant reçu une dose orale de 1g de resvératrol. Burkon et Somoza (Burkon and Somoza 2008) identifient et quantifient cinq

métabolites du resvératrol dans les plasmas et urines par chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse suivie d'une analyse en RMN. Les métabolites observés sont des formes glucurono- et sulfo-conjuguées du resvératrol et du dihydroxyresvératrol. Une fois absorbé, le resvératrol serait donc fortement métabolisé. A l'heure actuelle la biodisponibilité des stilbènes est focalisée sur celle du resvératrol. Néanmoins l'étude de Lv et collègues a mis en évidence que l'administration d'une dose orale de 50 mg/kg de picéide à des rats a conduit à une absorption rapide, après 10 minutes, de ce stilbène dans les cœurs, foies, poumons, reins, cerveaux et testicules des animaux (Lv, Zhang et al. 2006).

Matériel et Méthodes

1 Purification et caractérisation de polyphénols

Les flavonols caractérisés sont issus de la pellicule de baies de raisins de 6 espèces de vignes du genre *Vitis* : *V. Vinifera*, *V. Cinerea*, *V. Champinii*, *V. Doaniana*, *V. Candicans* et *V. Amurensis*. 200 baies ont été collectées de 3 pieds de chacune des espèces faisant partie de la collection de l'ISVV. Les protocoles expérimentaux sont détaillés dans la [publication B](#) en annexe (Hilbert, Tamsamani et al. 2015).

1.1 Extraction

Les pellicules ont été séparées de la pulpe et pesées immédiatement après récolte. Elles ont ensuite été congelées, broyées et lyophilisées. Pour chaque espèce, 300 mg de poudre ont été solubilisés dans 12 mL de méthanol à 0,1% d'acide formique. Cette solution est ensuite soumise à sonication pendant 2h afin de permettre la lyse des cellules végétales et la libération des composés phénoliques dans le solvant. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 4000 tour/minutes pendant 10 minutes et les surnageants sont collectés puis évaporés à froid. La coloration fortement rouge des échantillons est indicatrice de leur forte concentration en anthocyanes. Pour étudier les autres polyphénols, les anthocyanes sont éliminés en faisant passer l'échantillon sur une colonne Dowex (Sigma) échangeuse de cations. Les échantillons sont solubilisés avec 3,6 mL de méthanol acidifié avec 0,1% d'acide formique et 36 mL d'eau avant d'être passé sur la colonne Dowex. Les anthocyanes sont fixées sur la colonne et les autres polyphénols sont élués et récupérés avec du méthanol.

1.2 Caractérisation par LC-MS

Matériel

- Agilent série 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
- Colonne Prontosil C18 (5 µm, 250 mm x 4,6 mm) (Bischoff, Leonberg, Germany)
- Spectromètre de masse à trappe ionique Esquire 3000+ (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA)

Les échantillons de chaque espèce (10 µL) ont été injectés sur la colonne et élués avec un gradient d'eau / 10% d'acide formique (solvant A) et d'acétonitrile / 10% d'acide formique (solvant B). Le gradient utilisé est le suivant : 0 min 90% A 10% B, 55 min 65% A 35% B, 60 min 100% B et ce pendant 30 minutes, suivi de 10 minutes de rééquilibrage de la colonne. Le spectromètre de masse est équipé d'une source d'ionisation par electrospray (ESI). Les paramètres d'ionisation sont les suivants : gaz de séchage : 9 L/min, 350°C ; pression du nébuliseur 27 psi ; tensions des capillaires 4100 V).

La quantification des flavonols est réalisée en analysant le signal d'absorption émis à 360 nm, longueur d'onde caractéristique des flavonols. Les concentrations sont exprimées en mg équivalent de quercétine-3-*O*-glucoside par kg de masse de matière fraîche. Ce composé a été utilisé comme étalon externe. Les valeurs obtenues sont calculées à partir de triplicatas de mesures.

1.3 Caractérisation par LC-RMN

Matériel

- Agilent série 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
- Colonne Prontosil C18 (5 µm, 250 mm x 4.6 mm) (Bischoff, Leonberg, Germany)
- Spectromètre BRUKER AVANCE III 600 MHz
- Sonde LC-RMN ^1H - ^{13}C (volume de 120 µl) (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany)
- Collecteur de fraction FOXY (Teledyne ISCO, Lincoln, USA)

L'élution en LC-RMN est réalisée dans des conditions similaires à celles de la LC-MS. L'eau utilisée est deutérée avec 30% de D₂O afin de permettre des analyses directes par RMN. Les spectres RMN ^1H (600 MHz) ont été enregistrés avec un nombre de scans compris entre 64 et 1024. Les spectres ont été calibrés par rapport au signal résiduel de l'acétonitrile à δ_{H} 1.93 ppm.

Les composés ont été collectés sur collecteur de fraction FOXY TELEDYNE ISCO pour permettre des expériences complémentaires de RMN bidimensionnelle (RMN 2D). A la différence de l'HPLC analytique, le volume injecté peut varier entre 40 et 80 µL afin d'avoir suffisamment de matière pour l'acquisition des spectres RMN 2D.

2 Suivi de l'agrégation de l' α -synucléine par mesure de la fluorescence de la thioflavine T

La thioflavine T (ThT) est un benzothiazole qui possède un maximum d'excitation à 385 nm et un maximum d'émission à 445 nm. En solution, les cycles présentent une rotation libre autour de leur liaison carbone. Ce phénomène quenche l'état excité généré lors d'une excitation par photon, induisant donc une faible fluorescence. La ThT a la propriété de se fixer sur les feuillets β formés par des fibres de type amyloïde. La libre rotation de la molécule est alors bloquée. L'immobilisation de cette rotation induit une plus forte fluorescence en améliorant le rendement de fluorescence. La fixation de la ThT sur les feuillets β des fibrilles d' α -synucléine permet de suivre l'agrégation de cette protéine au cours du temps.

2.1 Cinétiques d'agrégation

Matériel

- Agitateur incubateur (VWR)
- Lecteur de plaque FLUOStar Optima (BGM Labtech)

Une solution stock à 2 mM de ThT est préparée dans le tampon suivant : 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 140 mM NaCl, pH 7,4. Cette solution stock est passée dans un bain à ultra-sons pendant 1 minute puis filtrée (filtre 0,22 μm). La solution stock peut être conservée une semaine au frais et à l'abri de la lumière. Avant chaque nouvelle expérience, la solution stock est diluée pour obtenir une solution à 400 μM de ThT. Celle-ci est à nouveau filtrée et soniquée. La concentration finale de ThT dans les puits sera de 20 μM . Ces étapes de sonication et de filtration nous permettent d'optimiser l'homogénéité de la solution. Les polyphénols sont solubilisés dans du DMSO à une concentration de 20 mM. La solution stock sera ensuite diluée dans le tampon précédant à la concentration désirée et de façon à avoir une concentration de 2% de DMSO. L' α -synucléine sera également solubilisée dans le tampon précédant à la concentration de 140 μM .

Le suivi de l'agrégation par fluorescence se fait dans des microplaques 96 puits. Le volume de solution réactionnelle est de 63 μL . La composition des puits pour la mesure de l'activité anti-

agrégative d'un composé est la suivante : 30 μL α -synucléine (concentration finale 70 μM), 30 μL stilbène, 3 μL ThT (concentration finale 20 μM). Des billes de silices sont ajoutées dans chaque puits. Ces billes ont pour rôle de favoriser l'agitation du faible volume dans les puits. Le lecteur de plaque est thermostaté à 37°C. Après une agitation de 300 rpm en début d'acquisition, des mesures successives de fluorescence sont réalisées. Les valeurs de ces mesures sont moyennées en fin d'acquisition. Cette mesure est réalisée régulièrement, environ toutes les deux heures. Entre chaque mesure, la plaque est placée dans un incubateur agitateur réglé à 37°C et à 300 rpm. La valeur de fluorescence basale qu'émet le puits contenant le puits de "blanc" est soustraite à la valeur de fluorescence enregistrée pour les puits de mesure contenant composé, ThT et α -synucléine en agrégation.

2.2 Mesure de déstabilisation des fibrilles d' α -synucléine

Matériel

- Agitateur incubateur (VWR)
- Lecteur de plaque FLUOStar Optima (BGM Labtech)

Des échantillons d' α -synucléine ont été mis à agréger durant 4 jours à la concentration de 70 μM suivant le protocole précédant. A l'issu des 4 jours d'agrégation, on ajoute 6 μL de composé pour obtenir des concentrations finales de 10, 100 ou 200 μM avec 1% DMSO. Le signal de fluorescence est alors mesurée durant 2h. Contrairement à l'expérience précédente, ici le signal est mesuré en continu et l'on programme une acquisition toute les 30 secondes durant 2 heures.

3 Observations par microscopie électronique

Matériel

- Grilles de TEM
- Microscope électronique CM120 (FEI)

Afin de réaliser les observations en microscopie électronique à transmission (MET) l' α -synucléine est agrégée pendant 4 jours, en présence ou non de stilbènes. A l'issu de

l'agrégation, contrôlée en parallèle par émission de fluorescence, les échantillons sont préparés pour l'observation en MET à coloration négative.

La coloration négative nécessite l'utilisation d'une grille de cuivre recouverte d'un film de carbone. Cette grille est rendue hydrophile juste avant le dépôt de l'échantillon, par un effet plasma (glow discharge). Suite à cela, une goutte de solution contenant l' α -synucléine agrégée est déposée à la surface de cette grille. L'excès de liquide est absorbé à l'aide d'un papier filtre. Puis une goutte d'acétate d'uranyle à 4% est déposée. De la même manière, l'excès est absorbé à l'aide d'un papier filtre. L'acétate d'uranyle est un agent contrastant et va se déposer préférentiellement au bord des particules présentes dans l'échantillon. Ainsi, l'échantillon apparaît plus claire que les zones adjacentes d'où le nom de coloration négative. Cette technique est adaptée pour l'observation de macromolécules biologiques qui possèdent un très faible contraste intrinsèque.

L'observation des échantillons est réalisée sur un microscope électronique en transmission CM120 (FEI) à 120 kV et doté d'un filament d'hexaborure de lanthane (source d'électron). Les images sont acquises avec une caméra CCD 2k x 2k pixels (Gatan, Ca, USA). Les images obtenues sont finalement traitées avec le logiciel ImageJ.

4 Etude par électrophorèse

Matériel

- Gel précoulés Tris-Tricine 10%-20% polyacrylamide(Biorad)
- Cellule de migration Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Biorad)
- Centrifugeuse (Sigma Bioblock 3K18)
- Thermoblock (FALC)

Les expériences en électrophorèse sur gel de dodécylsulfate de sodium et de polyacrylamide (SDS-PAGE) sont réalisées selon le protocole de Meng et de ses collègues (Meng, Munishkina et al. 2010). Des échantillons d' α -synucléine agrégée en présence ou non de stilbène pendant 7 jours à 37°C et à 300 rpm sont préparés. Des contrôles de l'agrégation sont réalisés par mesure de fluorescence du ThT. 10 μ L de chaque échantillon à analyser sont soumis à centrifugation à 14000 rpm pendant 30 minutes. Les surnageant et culots sont récupérés. Le culot est repris dans 10 μ L de tampon. On ajoute ensuite 5 μ L d'un tampon de

charge 3X (0,25 M Tris, 8% SDS, 60% glycerol, 0,08% bleue de bromophénol, pH 6,8). Les échantillons sont ensuite chauffés à 50°C pendant 3 minutes.

La cuve de migration Biorad est mise en place en y insérant les deux gels pré-coulés Tris-Tricine 10%-20% polyacrylamide puis en remplissant les 2 compartiments de la cuve par du tampon de migration (0,20 M tricine, 0,20 M Tris, 0,55% SDS, pH 8,1). L'utilisation de gels à gradient de polyacrylamide permet d'affiner la résolution des bandes de migrations et d'obtenir une meilleure observation des protéines de petites tailles. Les différents échantillons et le marqueur de poids moléculaire sont délicatement incorporés aux gels. La migration est ensuite réalisée à un voltage constant à 200 V. Après 3h de migration, les gels sont retirés de leur support puis rincés 5 fois pendant 5 minutes à l'eau M.Q. Ils sont ensuite trempés dans la solution de coloration (0,1 % Bromophénol Blue R-250, 50 % Méthanol, 10% Acide acétique glacial) pendant la nuit. La décoloration des gels est ensuite réalisée avec une solution (40% Méthanol, 10% Acide acétique glacial) pendant 6h. Pour obtenir une image des gels, ceux-ci sont scannés à haute résolution.

5 Tests de viabilité cellulaire

Matériel

- Compteur de cellules MoxiZ (Orflo)
- Hôte MSC-Advantage™, Sécurité biologique classe II (Thermo Scientific)
- Incubateur IGO150 (Jouan)
- Centrifugeuse BR4 (Jouan)
- Microscope optique inversé TMS (Nikon)

Milieux de culture

- Dulbecco Modified Eagle Medium (4500 mg/L glucose, 110 mg/L sodium pyruvate, + glutamine) (DMEM)
- Dulbecco phosphate buffered saline (-NaCl, -MgCl)
- Trypsine-EDTA (0,5g Trypsine porcine, 0,2g EDTA)
- L-glutamine 200 mM
- 3-[4,5-diméthylethiazol-2-yl]-2,5-diphényltetrazolium (MTT)

Nous utilisons comme modèle d'étude la lignée cellulaire PC12. Ces cellules clonales de phéochromocytome sont des cellules souches issues de la médullo-surrénale de rat. Elles sont fournies par ATCC (Molsheim, France). Ces cellules sont un modèle cellulaire très utilisé pour étudier les dommages que peuvent subir les neurones. Cette lignée cellulaire neuronale présente une population homogène, contrairement à des cultures de cellules primaires du système nerveux, ce qui leur confère l'avantage d'être facile à manipuler.

Le milieu de culture des cellules PC12 est constitué d'un mélange de DMEM avec 2,5% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF), 15% de sérum de cheval et 1% d'un mélange antibactérien (100 U/ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine). Ce milieu est utilisé pour chaque repiquage de cellules. Les cellules sont incubées dans une étuve maintenue à 37°C en atmosphère humide dans un environnement à 5% CO₂.

Les repiquages sont effectués suivant un cycle de 3 jours / 4 jours. Avant chaque repiquage, tous les milieux et solutions sont à 37°C afin d'éviter un choc thermique pour les cellules. Le tapis cellulaire est rincé au PBS. Les cellules sont ensuite exposées à 7 mL de trypsine-EDTA (la trypsine étant une endoprotéase qui hydrolyse les liaisons peptidiques). Après 5 minutes d'incubation, l'action de la trypsine est stoppée par dilution en ajoutant 7 mL de PBS. Après centrifugation (5 minutes à 5000 rpm), les cellules sont récupérées puisensemencées à raison de $2 \cdot 10^6$ cellules dans 20mL de milieu complet.

Pour le besoin des expériences, les cellules PC12 sontensemencées dans des plaques de 96 puits à raison de $20 \cdot 10^3$ cellules par puits dans 200µL de milieu complet. Après 24h d'incubation, le milieu complet est retiré et remplacé par du milieu DMEM + L-glutamine contenant la protéine agrégée et/ou les polyphénols à tester.

La viabilité des cellules PC12 dans les différentes conditions est mesurée en utilisant le MTT ou 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium. Le MTT est un substrat de la succinate déshydrogénase, une enzyme mitochondriale. La succinate déshydrogénase est impliquée dans la chaîne de transport d'électrons lors de la respiration cellulaire, son activité est indicative de la vie de la cellule. Ainsi, seules les cellules vivantes, ayant une succinate déshydrogénase active, sont en mesure de transformer le MTT en formazan, un composé formant des cristaux violets.

Après traitement, les cellules sont donc incubées en présence de 0,5 mg/ml de MTT dans une solution de DMEM (0,1% L-glutamine) pendant 3h. A l'issue de l'incubation la solution est

retirée et l'on ajoute à chaque puits 100 μ L de DMSO afin de solubiliser les cristaux. La densité optique de chaque puit est ensuite mesurée à 595 nm. L'intensité d'absorbance est alors proportionnelle à la quantité de cellules vivantes dans le puits mesuré.

6 Etude sur membrane modèle

Matériel

- Kit Mini-extruder (Avanti Polar Lipids)
- Membranes polycarbonate (0,1 μ m, 0,2 μ m, 0,8 μ m) (Avanti Polar Lipids)
- Destruction Block
- Spectrophotomètre fluorescence (Varian)
- Colonne en verre

Les LUV (Large Unilamellar Vesicle) sont des vésicules phospholipidiques artificielles présentant une bicouche lipidique mimant une membrane cellulaire. Nous souhaitons produire des liposomes dont la bicouche est constituée du phospholipide POPG (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)). Le POPG est conservé à 10 mg/mL dans du chloroforme à -20°C en veillant à sceller le récipient en verre pour éviter l'évaporation du solvant. Cinquante μ L de cette solution sont placés dans un vial en verre avant que le chloroforme ne soit évaporé en appliquant un léger flux d'azote. Afin d'assurer une évaporation totale du solvant, le vial est placé sous vide pour une durée de 2 à 3 heures. Ces étapes d'évaporation du solvant conduisent à la formation d'un film lipidique sec au fond du vial. Ce film lipidique est ensuite hydraté par 1 mL d'une solution à 70 mM de calcéine dans un tampon LUV à 10 mM d'HEPES, 150 mM de NaCl, 1 mM d'EDTA à pH 7,4. L'hydratation du film lipidique va conduire à la formation de Large Multilamellar Vesicle (LMV) avec plusieurs bicouches lipidiques en oignon. Cette suspension lipidique subit 10 cycles de 'freeze-thaw'. Le vial est trempé successivement dans de l'eau tiède puis dans de l'azote liquide. Cette étape va conduire à la formation d'une population de vésicules majoritairement unilamellaires et de tailles homogènes dans la solution. Par un processus d'extrusion, on peut réduire la taille des vésicules ainsi obtenus jusqu'à obtenir des vésicules à une couche, d'un diamètre moyen de 100 nm. L'extrusion est réalisée à l'aide du kit 'Mini-Extruder' d'Avanti Polar Lipids. A l'aide de deux seringues Hamilton et d'un compartiment étanche accueillant

une membrane de polycarbonate, la solution est passée à travers une membrane de 0,8 μM une dizaine de fois, puis une membrane de 0,2 μM et enfin à travers une membrane de 0,1 nm. A l'issue de ces passages, on considère que la grande majorité de la population de vésicules lipidiques est d'un diamètre de 100 nm environ.

La quantification du matériel lipidique ainsi produit nécessite tout d'abord la purification des LUV, suivi d'un dosage phosphate. Le protocole décrit précédemment permet la production de LUV. Néanmoins la solution obtenue contient encore des LMV indésirables. L'obtention d'un échantillon contenant uniquement les LUV recherchés passe par une purification par chromatographie à exclusion de taille. La chromatographie à exclusion de taille est réalisée sur une colonne de Sephadex G-75. La résine Sephadex G-75 est hydratée avec un tampon 50 mM Tris, 100 mM NaCl à pH 7. On compte 250 mL de tampon pour hydrater 4g de résine, l'hydratation dure environ 3h et est réalisée sous vide afin de dégazer la solution et éviter la formation de bulles d'air. Le gel ainsi obtenu est ensuite coulé dans une colonne en verre. La solution de LUV précédemment préparée est déposée en tête de colonne. Une fois le volume de la préparation de LUVs entièrement engagé dans la colonne, on démarre l'élution avec un tampon LUV à un débit de 0,5 mL/min. Les LMV, plus volumineux, sont les premiers à être élués hors de la colonne, ils forment une phase orange sombre visible à l'œil nu. Cette phase est suivie d'une seconde d'apparence orange clair dans laquelle se trouvent les LUV. Le volume élué de cette seconde phase est récupéré.

Le dosage des phosphates est basé sur la méthode développée par Rouser et al. (Rouser, Fleischer et al. 1970). Les phospholipides sont quantifiés indirectement, en effectuant un dosage phosphate. La tête phosphates est détachée du corps du lipide par chauffage à haute température (150°C) et hydrolyse avec de l'acide perchlorique. L'interaction des groupements phosphates avec des molécules de molybdate d'ammonium, favorisée par de l'acide ascorbique, va ensuite conduire à l'apparition d'une coloration bleue de la solution qui sera proportionnelle à la quantité de phosphates qu'elle contient. Cette coloration est quantifiable par spectrométrie et peut être comparée à une gamme étalon réalisée parallèlement avec du KH_2PO_4 . La quantité de phosphates, et donc indirectement de phospholipides, présente dans chaque échantillon de LUV préparé est alors mesurée. Le suivi de la fuite de calceine encapsulée dans les LUV est réalisé dans des cuves de quartz. Des échantillons d' α -synucléine (70 μM) ont été mis à agréger pendant 4 jours en présence ou non de stilbènes à des concentrations allant de 10 à 200 μM .

Le signal est mesuré à une longueur d'onde d'émission de 520 nm pour une excitation à 490 nm. L'émission de 20 μ M de LUV (180 μ L) est mesurée pour définir le signal basal. Une fois que ce signal s'est stabilisé, on ajoute 30 μ L de l'échantillon d' α -synucléine agrégée en veillant à bien agiter par reflux la solution dans la cuve. Cet ajout de matériel agrégé va conduire à une hausse progressive du signal de fluorescence qui correspond à la fuite de calceïne en dehors des LUV, causé par un effet de perméabilisation membranaire. Une fois un plateau atteint, on ajoute du TX-100 10% dans le milieu afin briser les LUV et libérer l'intégralité de la calcéïne, ce qui émettra un signal de fluorescence qui sera pris pour référence comme étant 100 % de la fuite de la calcéïne.

7 Etude par dichroïsme circulaire

Matériel

- Spectrophotomètre JASCO J-815 (JASCO)
- Cuves en quartz 2mm pour dichroïsme circulaire

Les acquisitions sont réalisées en mesurant l'absorption des échantillons entre 195 et 250 nm à 100 nm/min à 20°C. De l' α -synucléine 100 μ M a été agrégée pendant 4 jours en présence de 50, 100 ou 200 μ M d' ϵ -viniférine. A la différence des précédentes expériences d'agrégation nous n'utilisons pas de DMSO pour solubiliser le composé car ce produit présente une forte absorption en UV et peut donc saturer le signal de dichroïsme circulaire. L' ϵ -viniférine est solubilisée dans du HFIP et l' α -synucléine est agrégée à avec 2% de HFIP final. L'HFIP n'impacte pas la fibrillation de la protéine comme l'ont montré Munishka *et collègues* (Munishkina, Phelan et al. 2003). L'agrégation est réalisée en présence de ThT afin de contrôler l'agrégation de la protéine. Chaque échantillon est dilué 5 fois puis 100 μ L sont placés dans une cuve en quartz. Les acquisitions sont réalisées en mesurant l'absorption des échantillons entre 195 et 250 nm à 100 nm/min à 20°C.

8 Etude par RMN

Matériel

- Spectromètre BRUKER AVANCE III 600 MHz (BRUKER)

Des expériences de titration en RMN ont été réalisées pour observer la variation du spectre de la protéine d' α -synucléine suites à des additions successives d'E-viniférine. L' α -synucléine est solubilisée à 150 μ M dans un tampon 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 10 mM Tris, 50 mM NaCl et 10% D_2O puis on enregistre le spectre de 150 μ L de cette solution. L' ϵ -viniférine et le picéatannol sont solubilisés à 7 mM dans le même tampon. Les ajouts sont effectués pour obtenir des rapports d' α -synucléine: E-viniférine de 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:5, 1:10 et 1:20.

Les spectres proton ont été réalisés avec une séquence de pré-saturation pour saturer le signal de l'eau. Toutes les acquisitions sont réalisées à 300° K. Les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance de 14,1 T opérant à 600 MHz en proton. Les acquisitions ont été réalisées à l'aide d'une sonde TXI 5 mm.

Résultats

1 Caractérisation des flavonols de la vigne

1.1 LC-MS et LC-RMN

La valorisation des produits vitivinicoles passe par une meilleure connaissance des composés phénoliques de la vigne et du vin. Dans ce but la constitution d'une banque de polyphénols de la vigne constitue la première étape en amont de l'étude des propriétés biologiques de ces composés. Le laboratoire développe des outils analytiques originaux pour la caractérisation des composés phénoliques comme la spectrométrie de masse ou la RMN. Dans cette étude nous avons souhaité développer la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) et à la RMN (LC-RMN) pour caractériser les flavonols de la vigne.

La LC-MS est une méthode de chimie analytique couplant la chromatographie liquide (HPLC) et la spectrométrie de masse. L'HPLC permet une séparation des composants d'un extrait végétal alors que la spectrométrie de masse permet l'identification de composés selon les ions moléculaires et fragments formés. La combinaison de ces deux techniques offre un outil très apprécié dans l'identification de métabolites secondaires comme les polyphénols (Moss, Mao et al. 2013, Rodríguez-Rivera, Lugo-Cervantes et al. 2014, Teixeira, Azevedo et al. 2016). Cependant, les analyses par LC-MS doivent être complétées dans un certain nombre de cas par des analyses par RMN. En effet, la spectrométrie de masse ne permet pas à elle seule l'identification de tous les composés d'un extrait (composés inconnu, isomérisation, etc.). Contrairement à la spectrométrie de masse, la RMN peut distinguer des isomères et identifier un composé inconnu. Cependant l'utilisation de la RMN nécessite l'isolement préalable du composé à étudier. De la même manière que la LC-MS, la LC-RMN permet de s'affranchir de cette étape de purification.

Le couplage des informations apportées par la LC-MS et la LC-RMN fait l'objet de la publication A en annexe (Richard, Temsamani et al. 2013). Cette publication présente également les différentes techniques d'analyses utilisables en LC-RMN. Les deux principales méthodes d'analyses disponibles au laboratoire sont le « stop-flow » et le stockage sur cartouches SPE. Les acquisitions en mode « stop-flow » sont adaptées à l'analyse de métabolites secondaires majoritaires de l'extrait. Pour les composés minoritaires, il est nécessaire de concentrer l'échantillon. Le mode « SPE » permet de réitérer l'injection plusieurs fois et ainsi de concentrer chaque composé sur une cartouche SPE jusqu'à ce que la

quantité de composé récoltée soit suffisante pour être analysée en RMN. Ce mode nécessite la mise au point du piégeage les cartouches SPE (Figure 20). La combinaison de la spectrométrie de masse et de la RMN facilite l'identification des composants d'un échantillon (Figure 21).

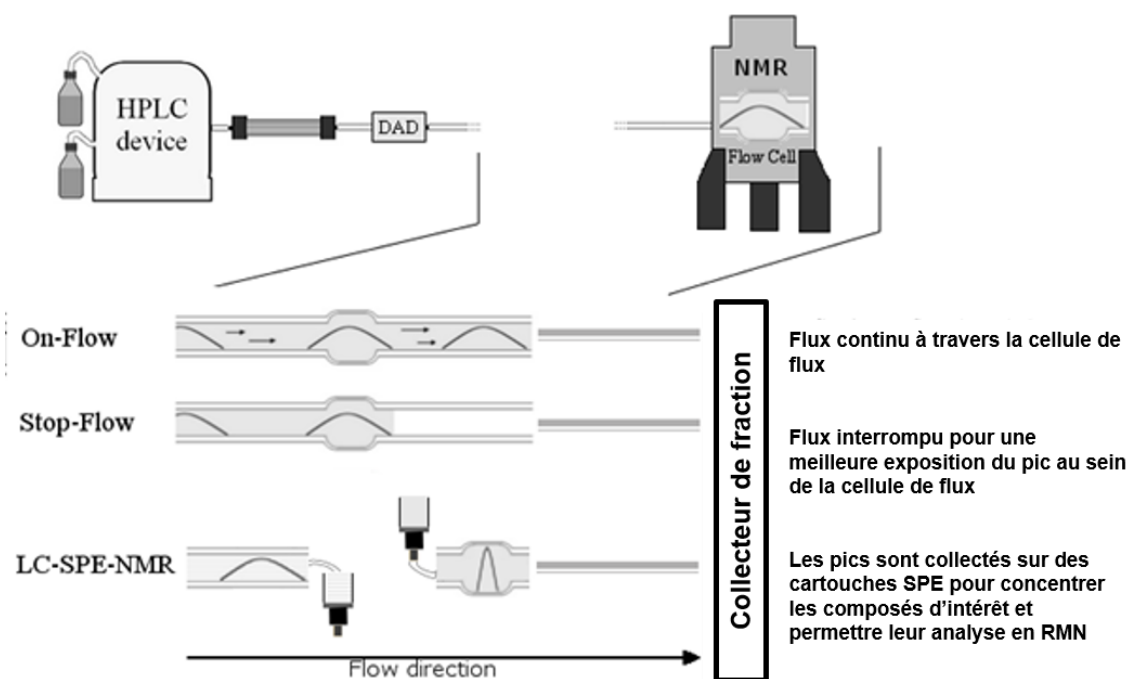


Figure 20 – Les méthodes de LC-RMN.

Les couplages LC-MS et LC-RMN ont été adaptés et développés, au sein du laboratoire, pour la caractérisation des anthocyanes des baies de raisin (Acevedo De la Cruz, Hilbert et al. 2012) et des stilbènes des sarments (Pawlus, Sahli et al. 2013). Concernant les anthocyanes, ces travaux ont conduit à l'identification et au dosage de 35 anthocyanes différents au sein de différentes espèces du genre *Vitis*. Au cours de ce travail de thèse, nous avons développé les couplages LC-MS et LC-RMN pour la caractérisation des flavonols des baies de raisin. Ces composés impactent la coloration des vins par un phénomène de co-pigmentation avec les anthocyanes (Schwarz, Picazo-Bacete et al. 2005).

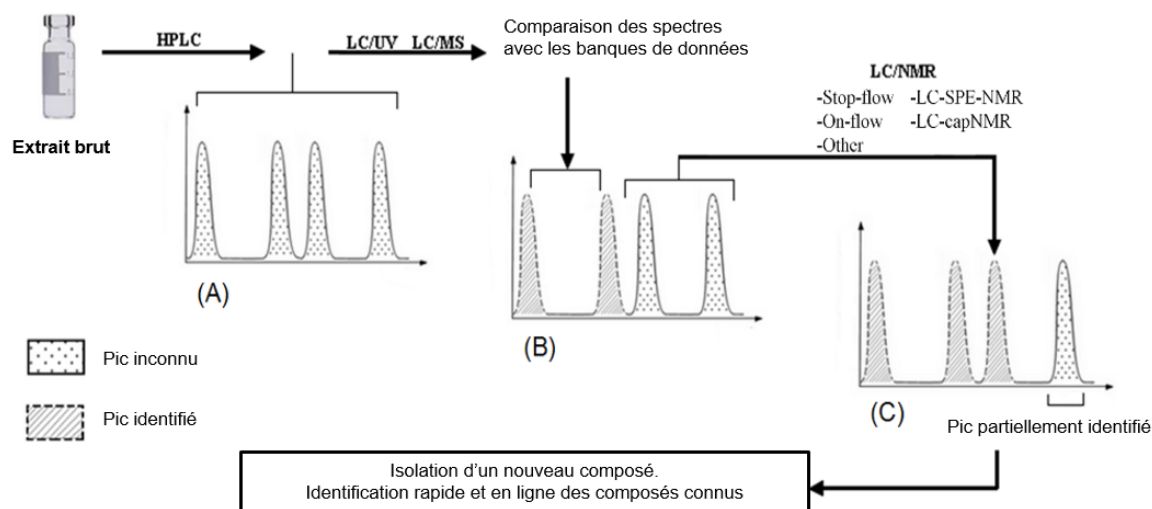


Figure 21 – Analyse d’un extrait végétal par LC-MS et LC-RMN.

(A) L’analyse par HPLC permet une séparation des composés à identifier. (B) Les données obtenues par LC-MS (temps de rétention, UV, masses) permettent d’identifier les composés connus. (C) Les pics n’ayant pas pu être identifié par la méthode précédente sont analyses par LC-RMN pour obtenir des données supplémentaires permettant leur identification par comparaison aux données RMN de la littérature. Certains pics peuvent correspondre à des composés inconnus et nécessitent une analyse RMN plus poussée. Cette méthode permet l’identification rapide et en ligne des

1.2 Flavonols des baies de raisin

Ces travaux se placent dans le cadre d’une collaboration avec l’équipe du Professeur Eric Gomes de l’UMR EGFV de l’Institut des Sciences de la Vigne et du Vin. Le but de ces travaux est la caractérisation et la valorisation de la collection de *Vitis* sauvage de l’Institut, constituée de plus de 70 accessions différentes. Au cours des travaux présentés dans la publication B (Hilbert, Temsamani et al. 2015), nous avons étudié la composition en flavonols de 6 espèces de *Vitis* : *V. Vinifera* (cépage Cabernet-Sauvignon), 4 *Vitis* américaines (*V. Doaniana*, *V. Cinerea*, *V. Candicans* et *V. Champinii*) et *V. Amurensis* originaire d’Asie. En effet, le composés phénoliques des espèces sauvages de *Vitis* ont été peu étudiés (Poudel,

Tamura et al. 2008, Liang, Yang et al. 2012). Les analyses ont été réalisées sur des extraits hydro-alcooliques de pellicules de raisins lyophilisées issues des pellicules des baies de chacune des espèces. Les extraits ont été filtrés sur une résine DOWEX pour éliminer les anthocyanes.

La figure 22 présente le chromatogramme d'un extrait de *V. Vinifera*. La caractérisation de l'extrait a été réalisée par combinaisons des analyses par LC-MS et LC-RMN (Tableau 5). Les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées en mode positif et en mode négatif. L'analyse des ions moléculaires et fragments obtenus par LC-MS permet d'identifier la nature des aglycones (par exemple, m/z 301 : quercétine en mode négatif) ainsi que la nature des substituants (hexose, pentose, etc.). En effet, un ion moléculaire à m/z 463 donnant un ion fragment à m/z 301 nous indique qu'il s'agit d'un dérivé de la quercétine, la perte d'un fragment de m/z 162 suggère la présence d'un hexose. Cependant la LC-MS ne permet pas de conclure sur la nature de l'hexose. La mesure des constantes de couplage sur le spectre proton obtenu par LC-RMN permet de conclure sur la nature de l'hexoside (Moco, Tseng et al. 2006).

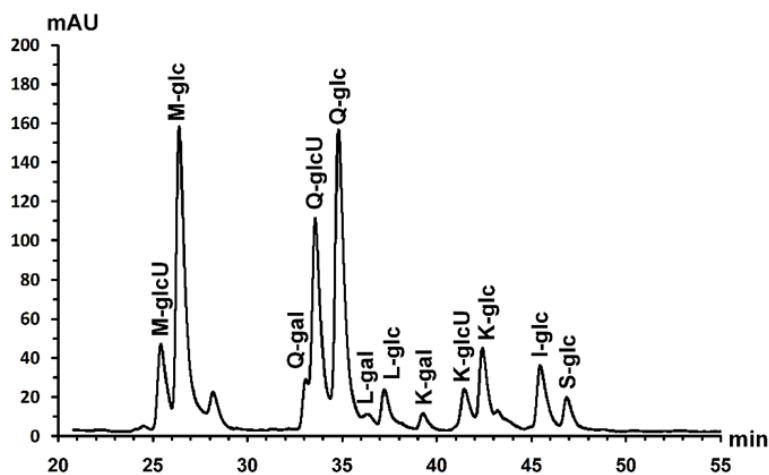


Figure 22 - Chromatogramme à 360 nm indiquant les flavonols contenus dans les extraits de baies de *V. Vinifera* (cv. Cabernet Sauvignon).

(M : myricétine ; Q : quercétine ; L : laricitrine ; K : kaempférol ; I : isorhamnétine ; S : syringétine ; glcU : 3-O-glucuronide ; gal : 3-O-galactoside ; glc : 3-O-glucoside)

L'analyse des données de spectrométrie de masse et la comparaison de ces données avec des standards a permis l'identification de plusieurs composés (Tableau 5). Ce fut, par exemple, le cas de la quercétine 3-O-rhamnoside et de la rutine. Cependant, les données de spectrométrie

de masse n'ont pas permis d'identifier tous les composés. Les composés inconnus ont été identifiés par LC-RMN.

Pic	Flavonol	t_R (min)	MW	Ions moléculaires et fragments (m/z)		Données RMN: déplacements chimiques (ppm), multiplicité, J : constant de couple en Hz
				Mode positif	Mode négatif	
1	quercetin diglycoside	22.4	626	627, 465, 303	625, 463, 301	-
2	myricetin 3-O-glucuronide	25.4	494	495, 319	493, 317	7.32 (s, H-2'('8'')), 6.42 (d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.22 (d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.27 (d, $J = 7.3$, H-1''), 3.80-3.40 (H-2'' to H-5'')
3	myricetin 3-O-glucoside	26.2	480	481, 319	479, 317	7.38 (s, H-2'('8'')), 6.43 (d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.19 (d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.15 (d, $J = 7.3$, H-1''), 3.75 (dd, $J = 2.2$, 11.9 Hz, H-6a''), 3.60 (dd, $J = 5.5$, 11.9 Hz, H-6b''), 3.55-3.20 (H-2'' to H-5'')
4	myricetin 3-O-rhamnoside	30.2	464	465, 319	463, 317	6.95 (s, H-2'('8'')), 6.37 (d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.21 (d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.32 (d, $J = 1.6$, H-1''), 4.20-3.30 (H-2'' to H-5''), 0.95 (d, $J = 6.2$, CH ₃)
5	syringetin 3,7-O-diglucoside	31.0	670	671, 509, 347	669, 507, 345	7.13 (s, H-2'('8'')), 6.84 (d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.71 (d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.78 (d, $J = 7.8$, H-1''), 4.89 (d, $J = 7.5$, H-1''), 3.90 (s, OCH ₃), 4.13 (dd, $J = 3.0$, 11.4 Hz, H-6a'' and H-8a''), 4.05 (dd, $J = 6.4$, 11.4 Hz, H-6b'' and H-8b''), 3.80-3.20 (H-2'' to H-5'') and H-2'' to H-5'')
6	quercetin pentoside	31.5	434	435, 303	433, 301	-
7	quercetin 3-O-galactoside	33.1	464	465, 303	463, 301	7.84 (d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 7.59 (dd, $J = 2.1$, 8.5 Hz, H-6'), 6.87 (d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.41 (d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.21 (d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.17 (d, $J = 7.6$, H-1''), 3.85-3.45 (H-2'' to H-5'')
8	quercetin 3-O-glucuronide	33.5	478	479, 303	477, 301	7.64 (dd, $J = 2.1$, 8.5 Hz, H-6'), 7.63 (d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 6.85 (d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.41 (d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.21 (d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.34 (d, $J = 7.5$, H-1''), 3.75-3.45 (H-2'' to H-5'')
9	rutin	34.3	610	611, 465, 303	609, 463, 301	a
10	quercetin 3-O-glucoside	34.7	464	465, 303	463, 301	7.71 (d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 7.59 (dd, $J = 2.1$, 8.5 Hz, H-6'), 6.87 (d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.40 (d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.21 (d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.25 (d, $J = 7.5$, H-1''), 3.71 (dd, $J = 2.5$, 11.9 Hz, H-6a''), 3.57 (dd, $J = 5.3$, 11.9 Hz, H-6b''), 3.50-3.20 (H-2'' to H-5'')
11	laricitrin 3-O-galactoside	35.1	494	495, 333	493, 331	-
12	laricitrin 3-O-glucoside	37.1	494	495, 333	493, 331	7.56 (d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 7.31 (d, $J = 2.1$ Hz, H-6'), 6.42 (d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.21 (d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.41 (d, $J = 7.8$, H-1''), 3.93 (s, OCH ₃), 3.76 (dd, $J = 2.2$, 12.0 Hz, H-6a''), 3.60 (dd, $J = 5.8$, 12.0 Hz, H-6b''), 3.50-3.20 (H-2'' to H-5'')
13	kaempferol 3-O-galactoside	38.9	448	449, 287	447, 285	8.07 (d, $J = 8.5$ Hz, H-2'('8'')), 6.87 (d, $J = 8.5$ Hz, H-3'('5'')), 6.39 (d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.21 (d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.31 (d, $J = 7.9$, H-1''), 3.80-3.45 (H-2'' to H-5'')
14	quercetin 3-O-rhamnoside	40.7	448	449, 303	447, 301	a
15	myricetin	40.8	318	319	317	-
16	kaempferol 3-O-glucuronide	41.2	462	463, 287	461, 285	8.06 (d, $J = 8.5$ Hz, H-2'('8'')), 6.87 (d, $J = 8.5$ Hz, H-3'('5'')), 6.41 (d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.20 (d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.13 (d, $J = 7.9$, H-1''), 3.75-3.40 (H-2'' to H-5'')
17	kaempferol 3-O-glucoside	39.8	448	449, 287	447, 285	8.05 (d, $J = 8.5$ Hz, H-2'('8'')), 6.88 (d, $J = 8.5$ Hz, H-3'('5'')), 6.40 (d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.19 (d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.22 (d, $J = 7.8$, H-1''), 3.73 (dd, $J = 2.1$, 12.0 Hz, H-6a''), 3.57 (dd, $J = 5.9$, 12.0 Hz, H-6b''), 3.50-3.20 (H-2'' to H-5'')
18	isorhamnetin 3-O-glucoside	45.1	478	479, 317	477, 315	7.89 (d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 7.59 (dd, $J = 2.1$, 8.5 Hz, H-6'), 6.86 (d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.40 (d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.20 (d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.37 (d, $J = 7.8$, H-1''), 3.95 (s, OCH ₃), 3.74 (dd, $J = 2.1$, 12.1 Hz, H-6a''), 3.56 (dd, $J = 5.6$, 12.1 Hz, H-6b''), 3.85-3.45 (H-2'' to H-5'')
19	syringetin 3-O-glucoside	46.4	508	509, 347	507, 345	7.54 (s, H-2'('8'')), 6.45 (d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.23 (d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.48 (d, $J = 7.5$, H-1''), 3.95 (s, OCH ₃), 3.76 (dd, $J = 2.2$, 12.1 Hz, H-6a''), 3.58 (dd, $J = 5.5$, 12.1 Hz, H-6b''), 3.50-3.20 (H-2'' to H-5'')

Tableau 5 – Caractéristiques (temps de rétention, masses moléculaires, ions moléculaires et fragments, déplacements chimiques) des flavonols identifiés dans les espèces de *Vitis* étudiées.

Le pic 5 est un bon exemple des analyses par LC-RMN. Le spectre de masse fait apparaître un ion moléculaire à m/z 669 en mode négatif (Figure 23). La fragmentation de l'ion moléculaire

donne naissance à deux fragments à m/z 507 et de m/z 345 (Tableau 5). Ce profil correspond un dérivé dihexosides de la syringétine. Ce pic est minoritaire, il n'a pas été possible de l'analyser par LC-RMN « stop-flow ». De même le piégeage sur cartouches SPE n'a pas fonctionné. Nous avons donc procédé par collecte de l'échantillon à l'aide d'un collecteur de fraction directement placé en sorti de la sonde de LC-RMN. L'échantillon a ensuite été lyophilisé et analysé par RMN (Figure 23).

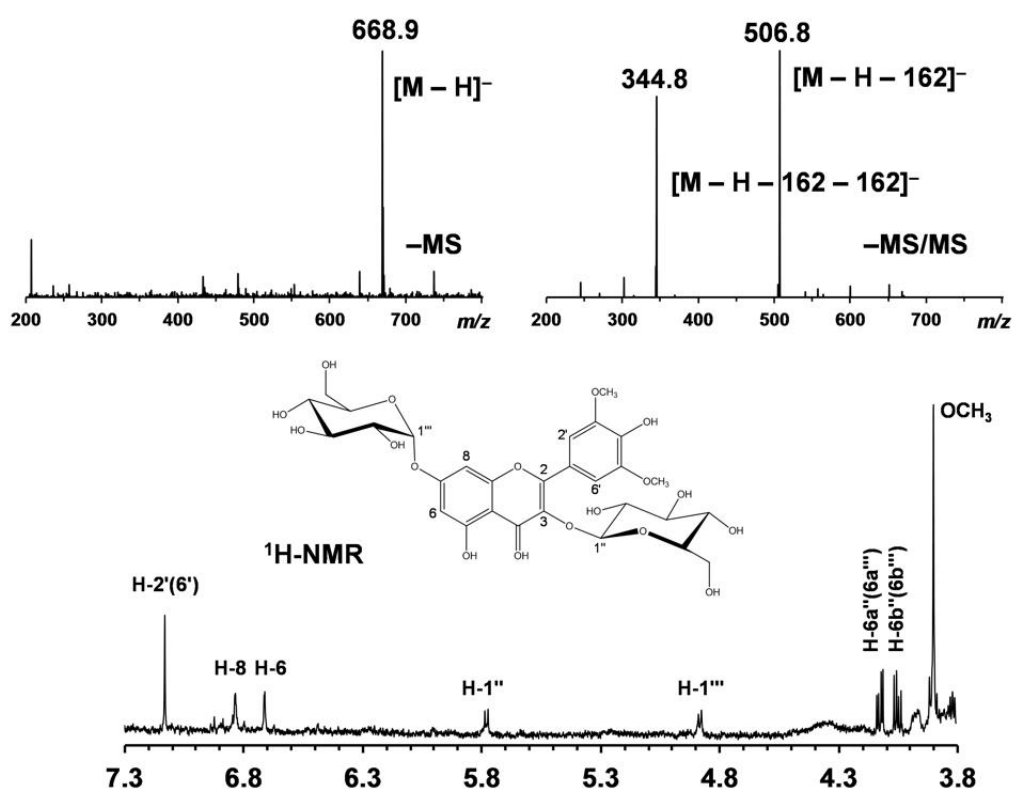


Figure 23 – Spectres de masse en mode négatif et ^1H -RMN du pic 5.

L'analyse des données de RMN a permis d'identifier ce composé (Tableau 5). Sur le spectre proton, les singulets observés à δ_{H} 7,13, 6,84 et 6,71 ppm ainsi que les deux doublets à δ_{H} 6,84 et 6,71 ppm (constante de couplage $J = 2,1$ Hz) sont caractéristiques de la syringétine (Moco, Tseng et al. 2006). Les deux doublets à δ_{H} 5,78 et 4,89 ppm avec une constante de couplage proche de 7,5 Hz sont caractéristiques des deux protons anomériques des hexosides. La constante de couplage voisine de 7,5 Hz indique que les deux hexoses sont en conformation β (Moco, Tseng et al. 2006). Enfin, l'analyse des constantes de couplage des

protons des hexoses montre que les deux oses sont des glucoses (Moco, Tseng et al. 2006). Le composé est donc un dérivé di-glucosylés de la syringétine. Afin de définir la position des deux glucoses, une expérience RMN ROESY a été réalisée. La carte bidimensionnelle ROESY permet de mettre en évidence des couplages entre protons proches dans l'espace de la molécule. Cette expérience nous a permis de déduire que les deux glucoses sont liés à la molécule sur les carbones C-3 et C-7 (Figure 23). La molécule recherchée est donc la syringétine 3,7-O-diglucoside. Le recours au couplage des informations apportées par la LC-MS et la LC-RMN a donc permis d'identifier un composé jamais identifié dans le genre *Vitis*.

Pic	Flavonol	V. vinifera		V. doaniana		V. candicans		V. champinii		V. cinerea		V. amurensis	
		mg/Kg	%	mg/Kg	%	mg/Kg	%	mg/Kg	%	mg/Kg	%	mg/Kg	%
1	Q-dihex	-		5.3 ± 1.3	4	0.9 ± 0.2	1	2.6 ± 0.8	3	0.7 ± 0.1	1	3.7 ± 0.4	4
2	M-glcU	19.8 ± 1.0	7	3.6 ± 1.4	3	1.8 ± 0.6	2	1.1 ± 0.5	1	NQ	<1	NQ	<1
3	M-glc	79.7 ± 10.5	28	69.2 ± 9.7	54	55.0 ± 19.1	67	58.4 ± 6.5	68	32.1 ± 2.4	53	62.5 ± 7.3	70
4	M-rham	-		-		-		-		1.8 ± 0.6	3	-	
5	S-diglu	-		3.7 ± 3.3	3	-		-		-		-	
6	Q-pent	-		8.8 ± 1.5	7	4.5 ± 1.1	5	4.5 ± 1.2	5	9.0 ± 2.4	15	7.7 ± 0.8	9
7	Q-gal	2.3 ± 0.1	1	-		-		-		-		-	
8	Q-glcU	42.4 ± 2.0	15	20.7 ± 5.8	16	8.5 ± 2.3	10	8.2 ± 3.9	9	1.6 ± 0.2	3	3.5 ± 0.5	4
9	Q-rham-glc	ND		-		-		-		-		-	
10	Q-glc	77.9 ± 7.9	27	4.7 ± 1.4	4	7.8 ± 2.2	9	2.2 ± 2.0	2	6.1 ± 1.0	10	3.3 ± 0.4	4
11	L-gal	1.3 ± 0.5	<1	-		-		-		-		-	
12	L-glc	7.7 ± 0.4	3	3.9 ± 0.3	3	1.4 ± 0.2	2	1.5 ± 0.8	2	1.6 ± 0.3	3	2.2 ± 0.2	2
13	K-gal	3.8 ± 0.4	1	-		-		-		-		-	
14	Q-rham	-		-		-		-		NQ	<1	-	
15	M	-		5.0 ± 0.3	4	1.4 ± 0.8	2	8.2 ± 3.9	9	5.6 ± 2.2	9	4.3 ± 1.1	5
16	K-glcU	8.5 ± 0.8	3	-		-		-		-		-	
17	K-glc	16.4 ± 1.5	6	-		-		-		-		-	
18	I-glc	17.9 ± 2.5	6	0.6 ± 0.4	<1	1.0 ± 0.5	1	0.6 ± 0.1	1	1.3 ± 0.5	2	0.7 ± 0.4	1
19	S-glc	7.0 ± 1.2	2	1.5 ± 0.2	1	NQ	<1	NQ	<1	0.7 ± 0.2	1	NQ	<1

Tableau 6 - Teneurs en flavonols dans la pellicule des baies de raisins.

A la suite de ce travail d'identification, le dosage des principaux flavonols des espèces de *Vitis* a été réalisé (Tableaux 6 et 7). Comme dans le cas des anthocyanes (Acevedo De la Cruz, Hilbert et al. 2012), les *Vitis* sauvages présentent une plus grande diversité composés que la vigne domestique (*V. vinifera*). Nous avons identifié des formes diglucosylées (quercétine et syringétine) chez les différentes *Vitis* sauvages, des rhamnosides chez *V. Cinerea* et une forme pentoside de la quercétine (Tableau 6). Ces derniers dérivés seraient

caractéristiques des vignes présentes dans le sud-ouest des Etats-Unis (Sandhu and Gu 2010) et pourraient ainsi représenter des marqueurs de certaines espèces de *Vitis*. Enfin, le dosage des flavonols a mis en évidence certaines disparités entre les différentes espèces. On a ainsi pu constater que *V. Vinifera* diffère des espèces sauvages car son aglycone majoritaire est la quercétine tandis que c'est la myricétine chez les espèces sauvages (Tableau 7). Ces résultats mettent en évidence des différences de biosynthèse entre les espèces.

	V. vinifera		V. doaniana		V. candicans		V. champinii		V. cinerea		V. amurensis	
Flavonols	mg/Kg	%	mg/Kg	%	mg/Kg	%	mg/Kg	%	mg/Kg	%	mg/Kg	%
myricetin	99.5 ± 11.5	35	77.9 ± 11.4	61	58.1 ± 20.5	70	67.7 ± 10.9	77	39.5 ± 5.3	65	62.5 ± 7.3	76
quercetin	112.7 ± 10.0	43	3.6 ± 1.4	31	21.8 ± 5.9	26	17.5 ± 7.9	20	17.6 ± 3.9	29	18.3 ± 2.1	21
laricitrin	9.0 ± 0.9	3	3.9 ± 0.3	3	1.4 ± 0.2	2	1.5 ± 0.8	2	1.6 ± 0.3	3	2.2 ± 0.2	2
kaempferol	28.7 ± 2.8	10	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0
isorhamnetin	17.9 ± 2.5	6	0.6 ± 0.4	<1	1.0 ± 0.5	1	0.6 ± 0.1	1	1.3 ± 0.5	2	0.7 ± 0.4	1
syringetin	7.0 ± 1.2	2	3.7 ± 3.3	4	NQ	<1	NQ	<1	0.7 ± 0.2	1	NQ	<1
glucoside	206.5 ± 24.1	72	79.9 ± 12.0	62	65.5 ± 22.2	79	63.2 ± 9.5	73	41.8 ± 4.3	69	69.3 ± 8.5	77
galactoside	7.4 ± 1.0	2	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0
glucuronide	70.8 ± 3.8	25	24.3 ± 7.2	19	10.3 ± 2.9	12	9.2 ± 4.4	10	1.6 ± 0.2	4	3.5 ± 0.5	5
rhamnoside	-	0	-	0	-	0	-	0	1.8 ± 0.6	3	-	0
pentoside	-	0	8.8 ± 1.5	7	4.5 ± 1.1	5	4.5 ± 1.2	5	9.0 ± 2.4	15	7.7 ± 0.8	9
diglycoside	-	0	9.0 ± 4.6	7	0.9 ± 0.2	1	2.6 ± 0.8	3	0.7 ± 0.1	1	3.7 ± 0.4	4

Tableau 7 - Teneurs des principales familles de flavonols identifiés dans les baies.

La combinaison de la LC-MS et de la LC-RMN nous a permis d'identifier avec précision le contenu en flavonols de différentes espèces. Le recours à la LC-RMN peut être apprécié car cette technique permet d'établir rapidement un profil complet et sans ambiguïtés des composants d'une source végétale. Les informations déduites de ces analyses précises nous ont permis de caractériser des différences entre des espèces de *Vitis*, d'identifier des composés originaux et de mettre en évidence certains marqueurs d'espèces du genre *Vitis*.

2 Effets des stilbènes sur l'agrégation de l' α -synucléine

2.1 Etude de l'agrégation de l' α -synucléine

L' α -synucléine est une protéine présente naturellement sous une forme non structurée. L'agrégation de l' α -synucléine est le passage de sa forme non-structurée et soluble à un état où les protéines sont partiellement structurées en feuillet β et interagissent entre elles pour former des protofibrilles puis des fibrilles (Breydo, Wu et al. 2012)

La cinétique d'agrégation de l' α -synucléine a été étudiée en utilisant la fluorescence de la thioflavine T. Ce composé a la propriété de se fixer sur les feuillets β formés. Cette fixation induit un changement de structure de la thioflavine T (ThT) induisant l'émission de fluorescence. Cette méthode est fréquemment utilisée pour étudier l'agrégation des protéines formant des feuillets β comme le peptide β -amyloïde et l' α -synucléine (Biancalana and Koide 2010).

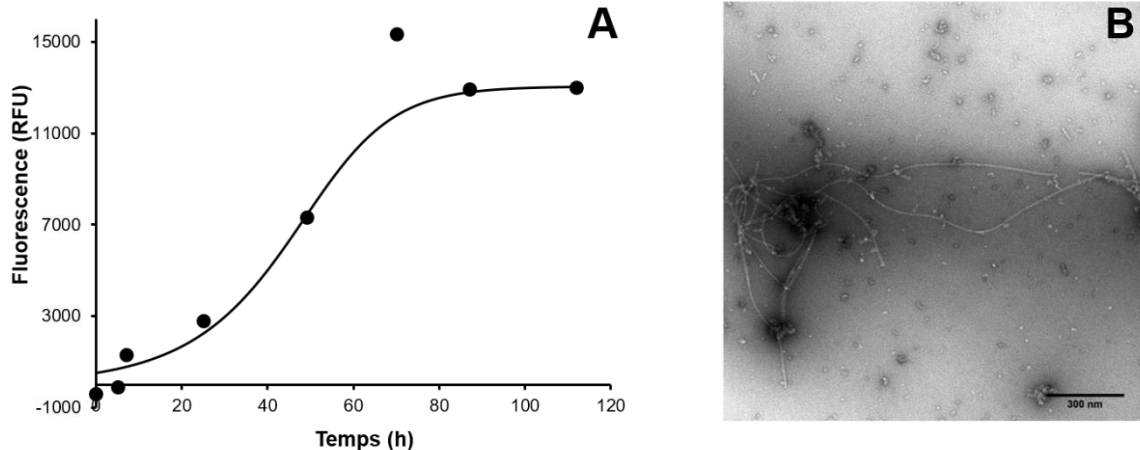


Figure 24 - Agrégation de l' α -synucléine.

Cinétique d'agrégation de l' α -synucléine suivi par la mesure de la fluorescence de la ThT (A). Fibrilles formées en fin d'agrégation observées par microscopie électronique (B).

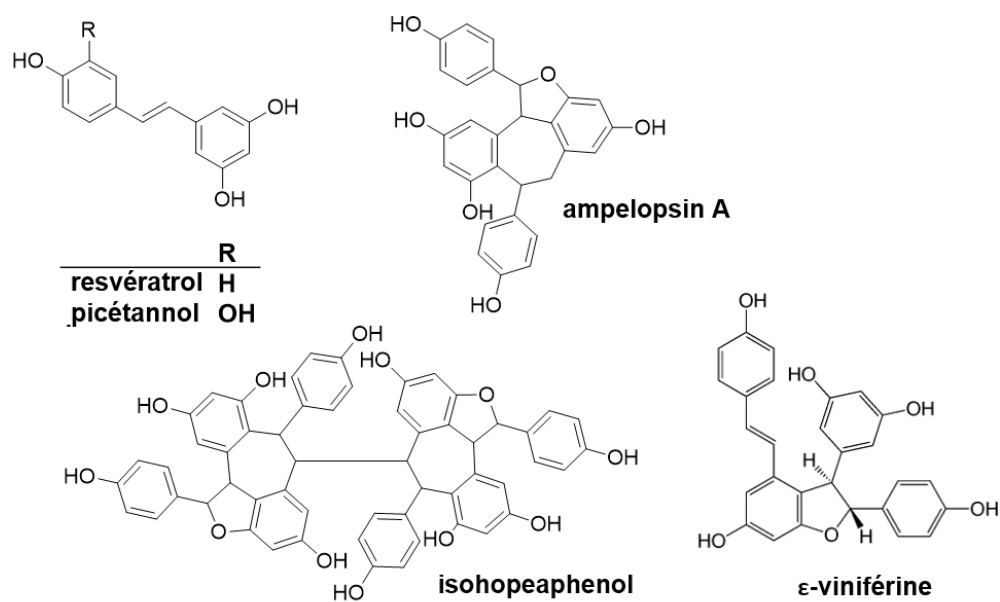
La cinétique d'agrégation de l' α -synucléine peut varier en fonction de plusieurs paramètres (Giehm and Otzen 2010). Il a été observé, par exemple, que le NaCl favorise l'agrégation de la protéine (Narkiewicz, Giachin et al. 2014). A un pH neutre, les anions du sel utilisé

pourraient induire la structuration partielle de la protéine en annulant ses charges de surface. L'agitation joue également un rôle. Sous agitation, les « chocs » efficaces entre protéines sont plus fréquents, ce qui serait favorable à la formation et l'élongation des fibres. De plus, il a été démontré qu'une agitation avec des billes de verres permettait d'améliorer la reproductibilité des expériences. Enfin, l'encombrement moléculaire pourrait favoriser les interactions entre protéines. En effet, l'ajout d'un agent d'encombrement moléculaire, tel que le DMSO, conduit à la formation d'un volume « inerte » dans la solution. Après différents essais, nous avons adopté un protocole adapté des travaux de Giehm *et collègues* (Giehm and Otzen 2010). Le protocole est décrit dans la partie matériel et méthodes.

Comme le montre la figure 24, dans nos conditions la cinétique de d'agrégation de l' α -synucléine se présente sous forme d'une sigmoïde (Figure 24). On peut y distinguer une première phase de nucléation, suivie d'une phase de croissance de multiplication et d'élongation de fibrilles, puis enfin une phase de plateau où le maximum d'agrégats fibrillaires s'est formé (Narkiewicz, Giachin et al. 2014). C'est donc dans ces conditions que sont réalisées les expériences de suivi d'agrégation dans les travaux de cette thèse.

2.2 Inhibition de l'agrégation de l' α -synucléine par les stilbènes de la vigne

Une fois le protocole d'agrégation mis en place, nous avons souhaité réaliser une étude sur la capacité des stilbènes de la vigne à inhiber l'agrégation de l' α -synucléine. Les molécules testées sont présentées dans la figure 25. Mis à part le resvératrol, l'ensemble des molécules testées a été produit au laboratoire à partir d'extraits de sarments fournis par la société Actichem. Le resvératrol est le stilbène le plus étudié dans la littérature. Le picéatannol est un dérivé monomérique du resvératrol et est purifié au GESVAB à partir de sarments de vigne. L' ϵ -viniférine est un dimère du resvératrol auparavant étudié au sein du GESVAB pour son activité anti-agrégative sur le peptide β -amyloïde (Richard, Papastamoulis et al. 2013). Cette molécule est aussi produite au laboratoire par chromatographie de partage centrifuge. L'ampélopsine A est également un dimère disponible au laboratoire issu de sarments de vigne. Enfin, l'isohopeaphenol est un tétramère du resvératrol issu de sarments de vigne et également présent dans le vin (Pawlus, Cantos-Villar et al. 2013).



Stilbène	Origine	Degrés d'oligomérisation
Resvératrol	SIGMA	1
Picéatannol	Purification Actichem	1
ε-viniférine	Purification Actichem	2
Ampelopsin A	Purification Actichem	2
Isohopeaphénol	Purification Actichem	4

Figure 25 - Stilbènes étudiés dans le cadre de ces travaux.

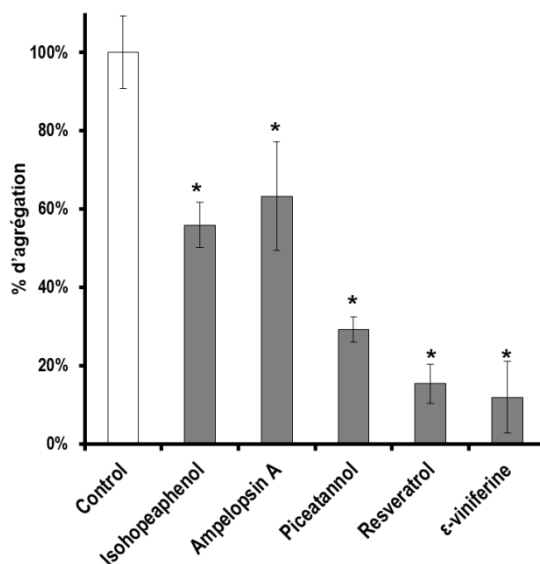


Figure 26 - L'agrégation de l'α-synucléine seule (control) et en présence de 100 μM de stilbènes (*p<0,05).

La figure 26 présente le pourcentage d'agrégation de l' α -synucléine obtenu en incubant la protéine avec ces stilbènes. Les résultats sont exprimés en pourcentage en prenant comme référence l'agrégation maximale obtenue lorsque l' α -synucléine est agrégée en absence de composé. Bien que tous les composés testés semblent inhiber l'agrégation de l' α -synucléine, ces résultats montrent que le resvératrol, le picéatannol et l' ϵ -viniférine sont les composés les plus actifs (réduction de l'agrégation de 62, 85 et 88%, respectivement).

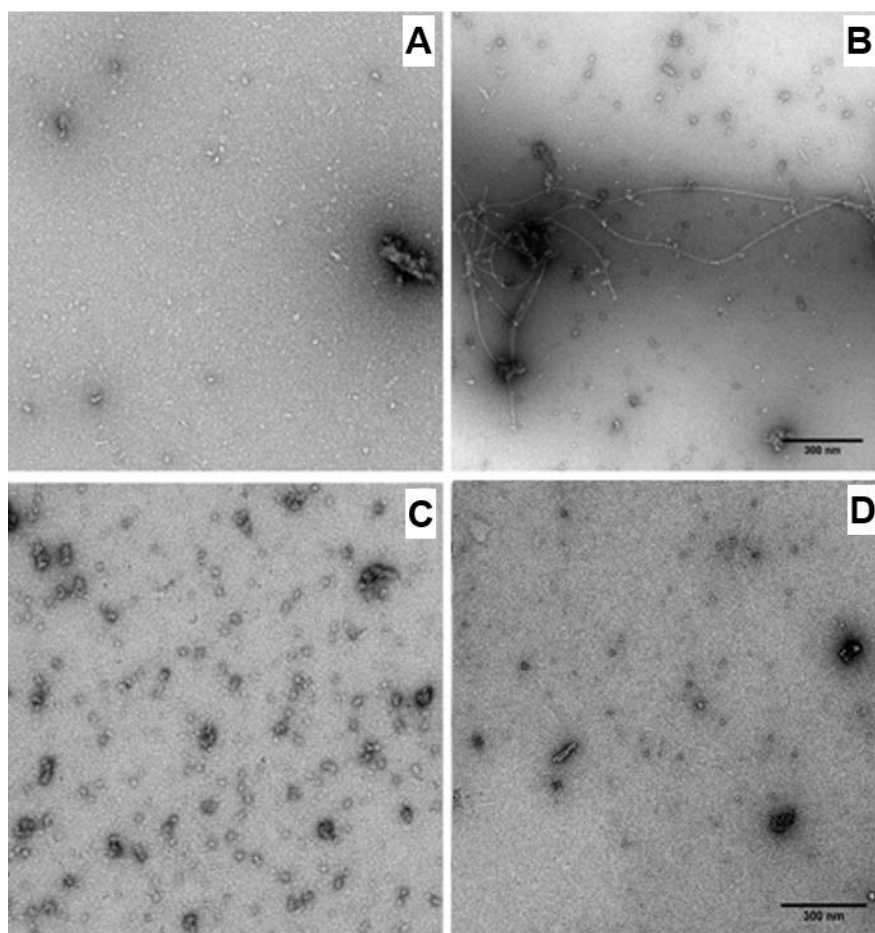


Figure 27 - Observation par MET de l'agrégation de l' α -synucléine.
 α -synucléine seule (70 μ M) t = 0 h (A), α -synucléine seule (70 μ M) t = 4 jours (B), α -synucléine en présence de picéatannol (100 μ M) t = 4 jours (C) ou 100 μ M d' ϵ -viniférine (100 μ M) t = 4 jours (D).

Les résultats obtenus à partir de l'émission de fluorescence de la ThT constituent des premiers éléments de réponse quant à l'activité anti-agrégative des stilbènes. Cependant il a été démontré que certains composés phénoliques peuvent causer un biais dans ce genre de

d'expérience : compétition entre la ThT et le composé testé, gammes d'absorptions proches, viscosité du milieu, etc. (Stsiapura, Maskevich et al. 2008, Hudson, Ecroyd et al. 2009). Pour

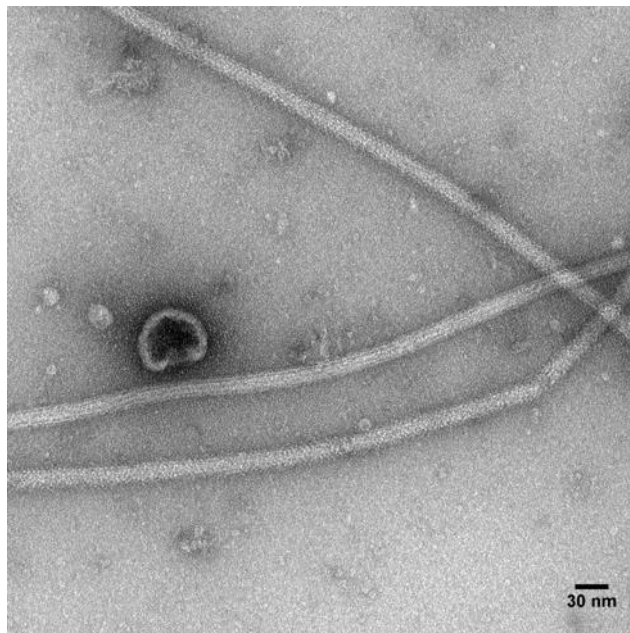


Figure 28 - Fibrilles d'α-synucléine.

confirmer l'inhibition de la formation des fibres d'α-synucléine des expériences de microscopie électronique ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du professeur Olivier Lambert au CBMN à Bordeaux (Figure 27). Nous pouvons observer que dans nos conditions d'agrégation, l'agrégation de la protéine seule induit la formation de fibrille d'une longueur variant entre 2 et 5 μM et d'une largeur de 15 nm (Figure 28). En revanche les échantillons d'α-synucléine incubée en présence de stilbènes pendant 4 jours ne présentent pas de fibrilles, ou très peu (Figure 27). On peut alors distinguer de petits agrégats non-structurés d'un diamètre avoisinant les 10 nm.

Nous avons également souhaité vérifier avec le test de la ThT que l'inhibition de l'agrégation de l'α-synucléine est proportionnelle à la concentration en stilbènes. Ces travaux ont été réalisés sur les trois composés les plus actifs : le resvératrol, le picéatannol et l'ε-viniférine. L'α-synucléine a donc été incubée en présence de différentes concentrations de stilbènes (100 μM et 200 μM). La figure 29 présente les résultats obtenus pour le resvératrol et picéatannol.

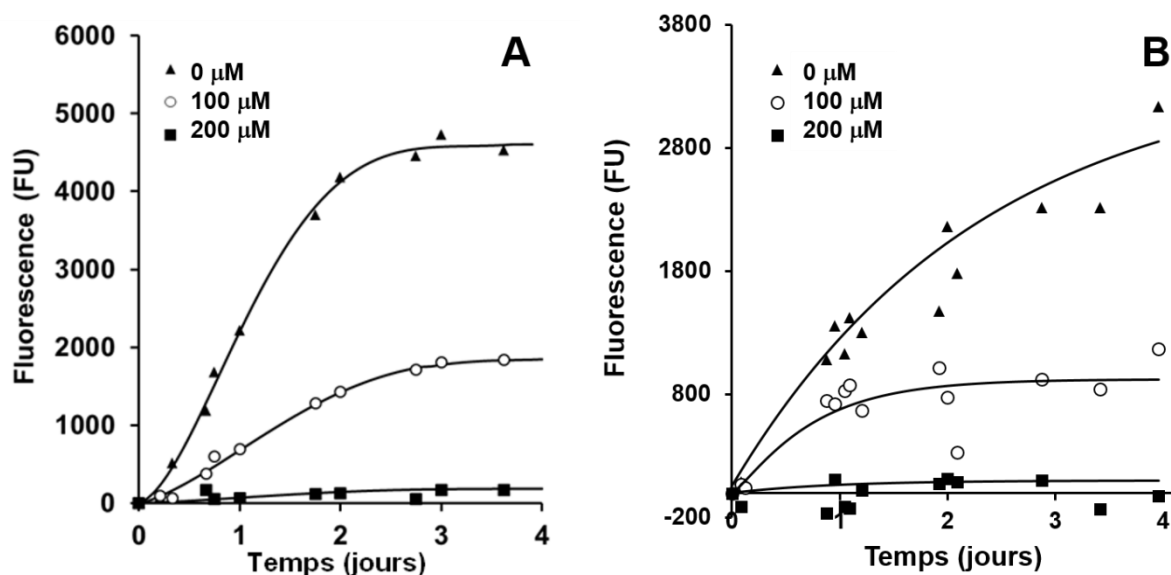


Figure 29 – Inhibition de l'agrégation de l' α -synucléine en fonction de la concentration en stilbènes

L' α -synucléine (70 μ M) est agrégée seul ou en présence de 100 ou 200 μ M de picéatannol (A) ou de resvératrol (B) pendant 4 jours.

A la concentration de 100 μ M les resvératrol et picéatannol réduisent l'agrégation de la protéine à des pourcentages proches de ceux présentés précédemment. En revanche, lorsque la protéine est incubée avec 200 μ M de resvératrol ou de picéatannol l'agrégation de l' α -synucléine est presque totalement neutralisée. L'effet inhibiteur des stilbènes est donc dépendant de leurs concentrations.

2.3 Déstabilisation des fibrilles d' α -synucléine

Les résultats précédents nous ont permis de montrer que le resvératrol, le picéatannol et l' ϵ -viniférine sont capables d'inhiber l'agrégation de l' α -synucléine. Nous avons alors souhaité étudier la capacité de ces stilbènes à déstabiliser des fibrilles matures. Pour cela nous avons fait agréger l' α -synucléine pendant 4 jours, jusqu'à l'apparition du plateau de fluorescence de la ThT. A l'issue de ces 4 jours, les stilbènes sont ajoutés à des concentrations différentes sur les fibrilles matures. Nous pouvons constater dans la figure 30 que l'ajout de

ces molécules conduits à la décroissance du signal de fluorescence de la ThT en moins de 20 minutes jusqu'à atteindre un plateau. Ces résultats indiquent que les stilbènes testés sont capables de réduire la population de fibrilles, probablement en déstabilisant les liaisons entre les briques de synucléines formant les fibres.

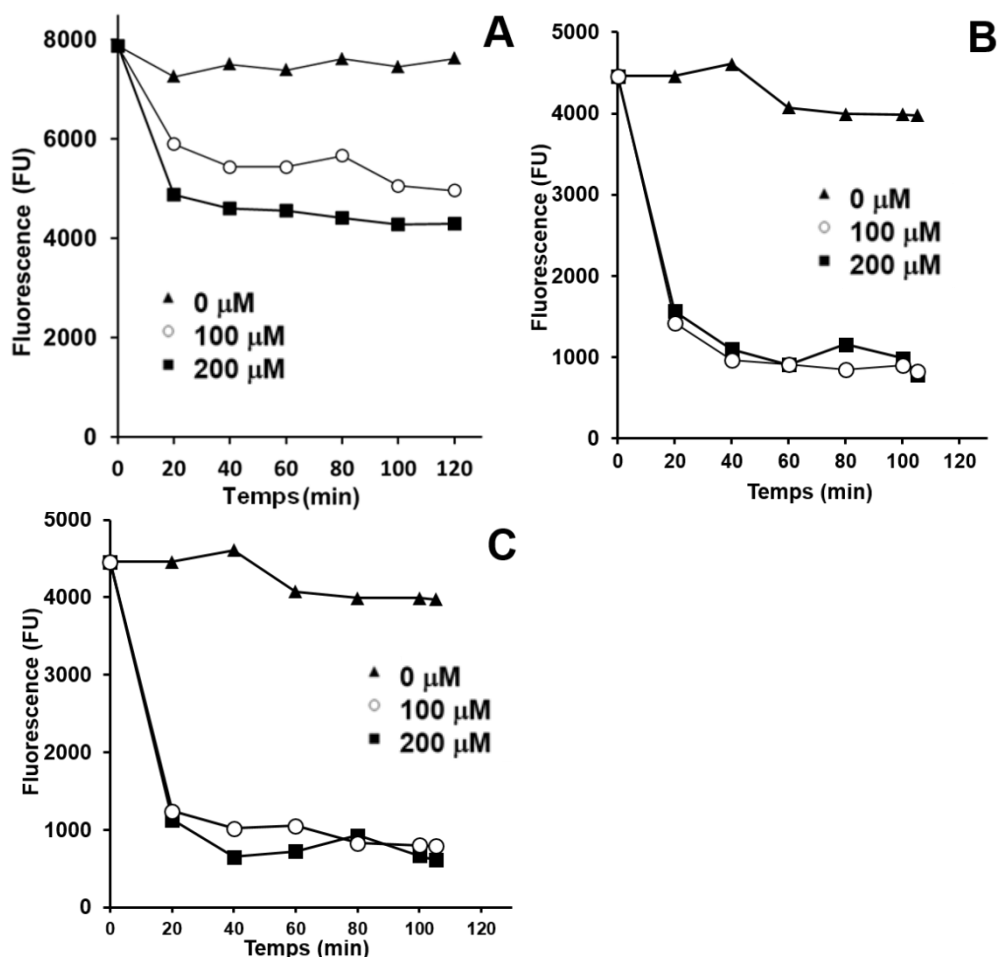


Figure 30 - Déstabilisation des fibrilles d' α -synucléine par les stilbènes.

L' α -synucléine 70 μM est agrégée jusqu'à former des fibrilles puis l'on ajoute des stilbènes à différentes concentrations (picéatannol (A), resvératrol (B) et l' ϵ -viniférine (C)).

Des études par microscopie électronique ont permis de confirmer les résultats obtenus par mesure de la fluorescence de la ThT. La figure 31 montre que l'addition de picéatannol ou d' ϵ -viniférine à des fibrilles formées précédemment conduit à une diminution drastique de la population de ces fibrilles en solutions. Sur des clichés réalisés 15 minutes après l'addition, des agrégats de petites tailles sont alors visibles. Cependant les observations par MET ne permettent pas de déduire la nature de ces agrégats, ni leur état de structuration.

Il a déjà été démontré que certains composés phénoliques ont la capacité de se lier à l' α -synucléine et d'empêcher la formation de fibrilles ainsi que la déstabilisation de fibrilles matures déjà formés (Zhu, Rajamani et al. 2004, Ono and Yamada 2006, Ehrnhoefer, Bieschke et al. 2008). Nos résultats montrent que certains stilbènes empêchent également l'agrégation de la protéine et induisent la déstabilisation des fibrilles déjà formées.

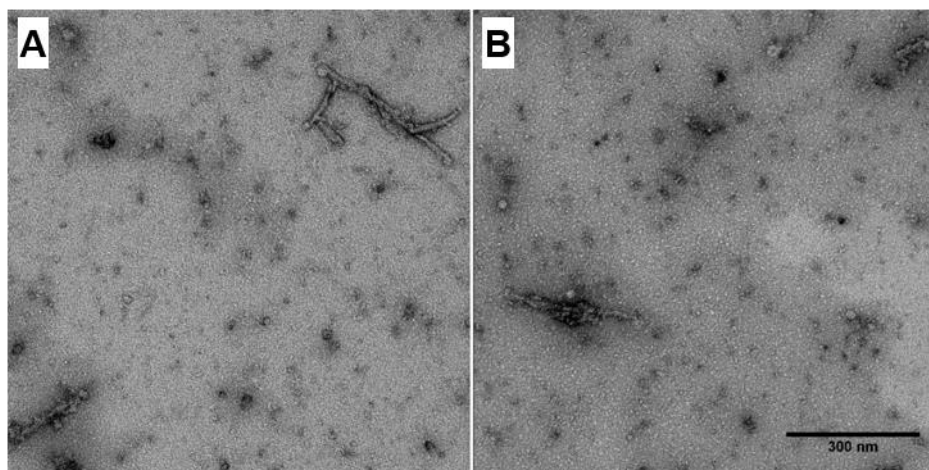


Figure 31 - Observation par MET de la déstabilisation des fibrilles d' α -synucléine.

Des fibrilles d' α -synucléine formées après 4 jours sont exposées à 100 μ M de picéatannol (A) ou 100 μ M d'e-viniférine (B). Les observations sont réalisées 15 minutes après exposition.

Une étude combinant microscopie électronique et AFM (microscopie à force atomique) (Zhu, Rajamani et al. 2004) a mis en évidence la capacité de la baicaléine à déstabiliser les fibrilles d' α -synucléine. Les résultats obtenus montrent que cette molécule conduit à la déstabilisation des fibrilles en agissant tout le long des fibrilles, et pas uniquement aux extrémités. La déstabilisation des fibrilles est là aussi suivie de l'apparition d'oligomères, en accord avec les observations que nous avons réalisées.

2.4 Etude par électrophorèse des agrégats formés

Les expériences précédentes montrent que certains stilbènes peuvent inhiber la formation de fibres de synucléine et déstructurer des fibrilles matures. Cependant, il a été montré que la

toxicité de l' α -synucléine est due à des formes intermédiaires de l'agrégation de la protéine (Winner, Jappelli et al. 2011). Il est donc fondamental de déterminer la nature des espèces formées après inhibition de la formation des fibres d' α -synucléine ou après leur déstabilisation. Pour cela, nous utilisons l'électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium ou SDS-PAGE. L'objectif étant de déterminer le degré d'oligomérisation des agrégats qui se forment en présence de stilbènes.

Des échantillons d' α -synucléine ont été mis à agréger en présence ou non de stilbènes pendant 7 jours, dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. Les échantillons ont ensuite été centrifugés pour séparer le culot du surnageant. L'électrophorèse est réalisée sur les surnageants et les culots qui sont exposés au SDS avant la migration sur gel dénaturant. Les résultats sont illustrés dans la figure 32

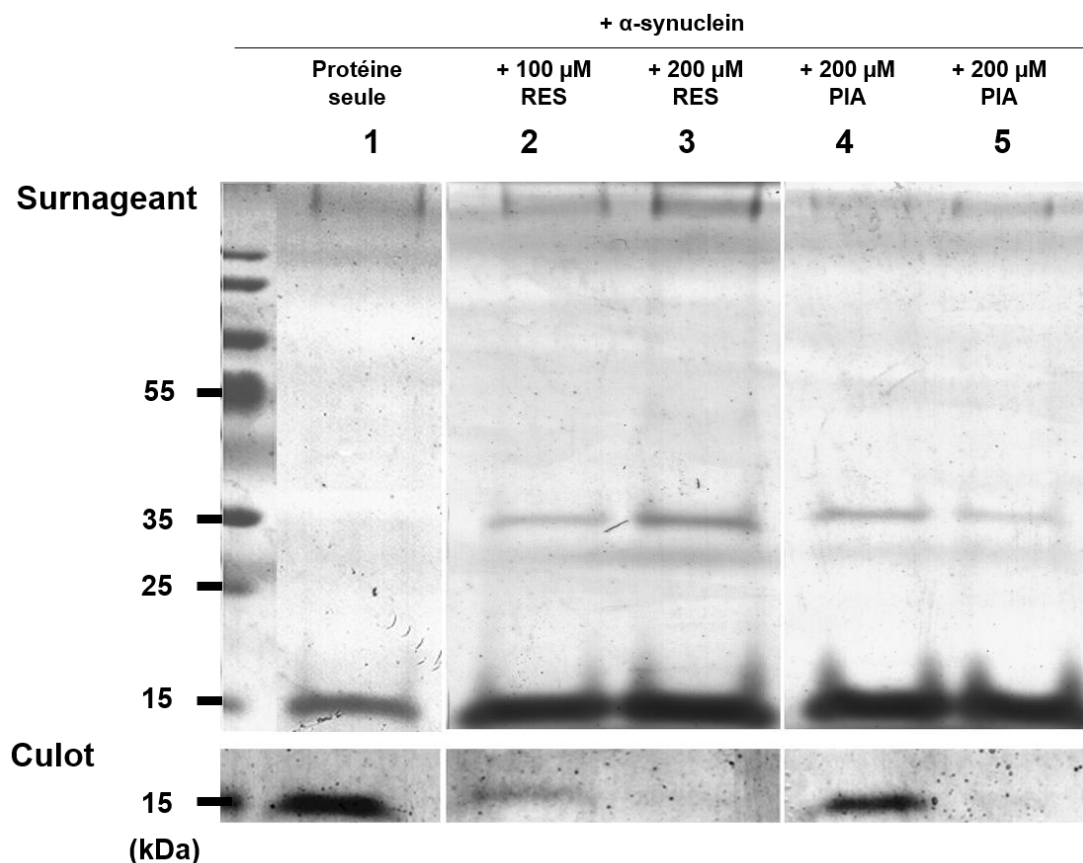


Figure 32 - Migration sur gel SDS-PAGE d'échantillons agrégés d' α -synucléine

L' α -synucléine est mise à agrégation pendant 7 jours seule (A), en présence de 100 μ M (2) ou 200 μ M (3) de resvératrol ou en présence de 100 μ M (4) ou 200 μ M (5) de picéatannol. Chaque échantillon est centrifugé puis les culots et surnageant sont dénaturés 5 min à 50 °C en présence de SDS avant d'être soumis à la migration sur gel polyacrylamide.

Cappai *et collègues* (Cappai, Leck et al. 2005) ont montré que les fibrilles d' l' α -synucléine sont sensibles aux SDS, ce qui se traduirait par une dénaturation des fibrilles en formes monomériques, en présence de SDS. Les auteurs précisent que les formes oligomériques ne sont pas sensibles au SDS, et ne sont donc pas dénaturées. Sur la figure 31, nous observons que les protéines du culot migrent uniquement à un poids moléculaire proche de 15 kDa, correspondant à celui du poids de l' α -synucléine monomérique. Ces bandes sont donc représentatives des fibrilles sensibles au SDS.

Nos résultats montrent que l'échantillon d' α -synucléine agrégée seule est riche en forme fibrillaires (dans le culot) et contient encore des monomères (dans le surnageant). La présence de monomère serait ici indicative d'un équilibre en fibrilles et monomères d' α -synucléine. En revanche, l'agrégation de la protéine en présence de 100 μ M de picéatannol ou de resvératrol donne lieu à un échantillon plus riche en monomère avec une faible quantité de fibrilles. En présence de 200 μ M de stilbènes, les fibrilles sont absentes des échantillons. Les resvératrol et picéatannol favoriseraient la formation de trimères correspondants aux bandes à 35 kDa observées sur le gel. Concernant le resvératrol, on constate qu'une concentration croissante de ce stilbène induit une plus grande quantité de ces trimères. La différence est moins visible dans le cas du picéatannol.

Les stilbènes préviendraient donc la formation des fibrilles d' α -synucléine en conservant la protéine dans un état monomérique et en donnant lieu à des trimères. Cette observation est cohérente avec les résultats obtenus par d'autres équipes (Ehrnhoefer, Bieschke et al. 2008). Il apparaîtrait que les oligomères d' α -synucléine formés par les polyphénols seraient non-toxiques pour les cellules, c'est pourquoi nous avons souhaité étudier la toxicité des oligomères formés par l' α -synucléine lorsqu'elle est en présence de stilbènes.

2.5 Etude par dichroïsme circulaire des agrégats formés

L'agrégation de l' α -synucléine en fibrilles conduit à la structuration partielle de la protéine en feuillets β (Cheruvuvar, Allen-Baume et al. 2015). La proportion de feuillet β au sein de la protéine augmente en fonction du degré d'agrégation de celle-ci (Apetri, Maiti et al. 2006). La solubilisation de l' α -synucléine donnerait rapidement lieu à l'apparition de petits oligomères sphériques, dont le pourcentage en feuillet β est de l'ordre de 30%. Après un temps

d'incubation et d'agrégation, la majorité de la population d' α -synucléine est agrégée en protofibrilles avec un pourcentage de 50% de feuillets β . A l'issue de l'agrégation de la protéine le pourcentage en feuillet β des fibrilles est proche de 70 %. L'observation de l'état de la structure secondaire de la protéine peut donc renseigner sur son état d'agrégation.

C'est pourquoi, en collaboration avec le laboratoire ICMV (UMR CNRS 6226) de Rennes, nous avons réalisé des mesures du dichroïsme circulaire (CD) afin d'estimer la capacité de l' ϵ -viniférine à prévenir la formation de feuillet β au sein de l' α -synucléine. Les résultats sont présentés dans la figure 33.

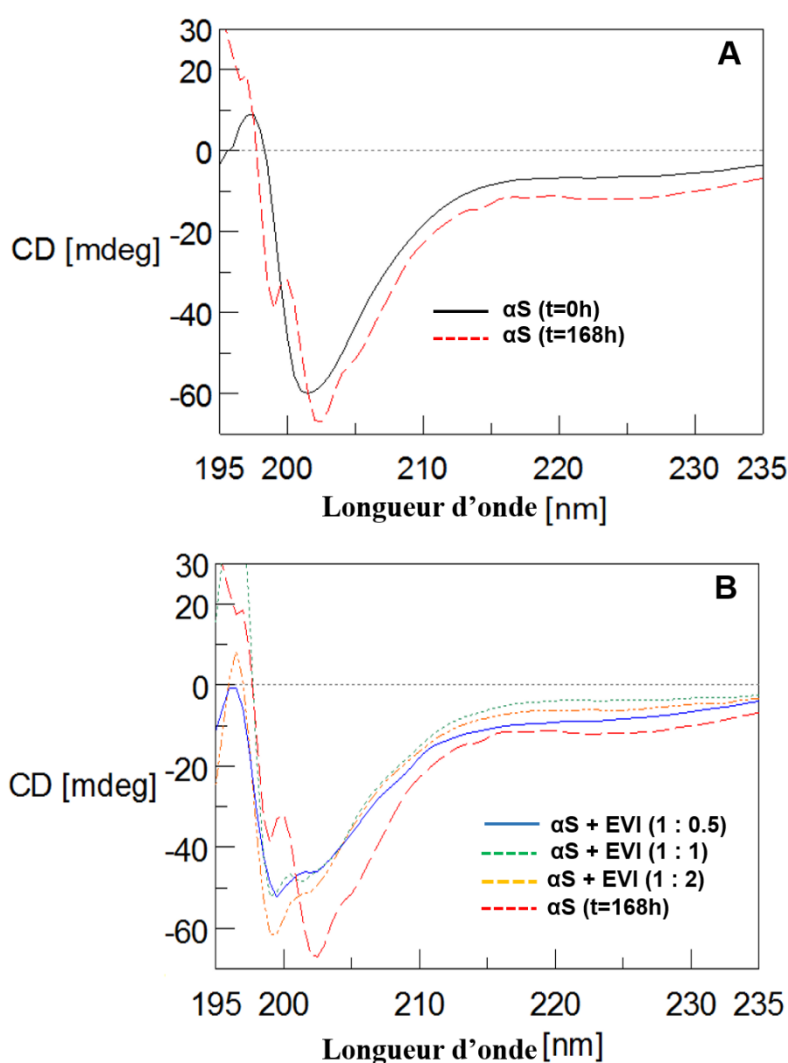


Figure 33 - Spectres de dichroïsme circulaire de l' α -synucléine.

Les spectres de CD de l' α -synucléine sont enregistrés avant et après incubation pendant 168 h (A) et après incubation en présence de différentes concentrations d' ϵ -viniférine (EVI) (B).

Le signal caractéristique en dichroïsme circulaire d'une protéine non structurée comporte un pic aux alentours de 200 nm tandis que celui d'une structure en feuillet β en comporte un près de 215 nm. Au temps $t = 0h$, avant incubation, le signal en CD de l' α -synucléine seule est proche de 200 nm (Figure 36A). Cependant, il est légèrement décalé vers la droite ce qui indiquerait que l' α -synucléine présente une faible part de feuillet β , au moment de l'enregistrement de son spectre de CD, comme l'ont décrit Apetri *et collègues* (Apetri, Maiti et al. 2006). Après 168h d'incubation, on observe que le spectre de l' α -synucléine se décale vers 215 nm et présente un épaulement caractéristique des structures en feuillets β . Ce signal correspondrait à un état combinant des protéines non structurées et d'autres en feuillet β , en accord avec des résultats similaires obtenus par Berrocal et collègues (Berrocal, Vasudevaraju et al. 2014).

Les mesures des spectres de CD des échantillons incubés en présence d' ϵ -viniférine mettent en évidence que l'addition de ce stilbène inhibe la structure secondaire de la protéine en feuillets β . En effet, quel que soit la concentration en ϵ -viniférine, on observe un spectre similaire à celui de la protéine non agrégée avec pic voisin de 200 nm. De plus, les spectres de CD de l' α -synucléine en présence d' ϵ -viniférine sont légèrement plus décalés sur la gauche par rapport à celui de la protéine seule non agrégée ($t = 0h$). Il semblerait donc que l' ϵ -viniférine soit à la fois capable de bloquer la formation de feuillets β et de déstructurer les feuillets β déjà formés avant l'enregistrement des spectres de CD.

Les spectres de CD nous confirment la capacité de l' ϵ -viniférine à prévenir l'agrégation de l' α -synucléine en empêchant sa structuration, mais aussi en déstabilisant les formes agrégées formées à la solubilisation pour conduire à la formation de composants non-structurés en feuillet β .

2.6 Etude par RMN de l'interaction synucléine/stilbènes

Afin de déterminer la spécificité et les sites d'interactions des stilbènes avec l' α -synucléine, nous avons réalisé des expériences de RMN du proton. Les expériences de RMN permettent d'enregistrer le déplacement chimique des protons composants la protéine, ce signal varie en fonction de l'environnement électronique des protons. L'interaction d'un résidu de la chaîne

peptidique avec un stilbène peut conduire à une modification du déplacement chimique des protons de la protéine et à la diminution de l'intensité du signal enregistré.

L' α -synucléine est une protéine de 140 acides aminés, son spectre RMN du proton est présenté en figure 34. On peut constater que les pics composants son spectre proton sont complexes à distinguer. Les pics de ce spectre peuvent être attribués à plusieurs types de protons.

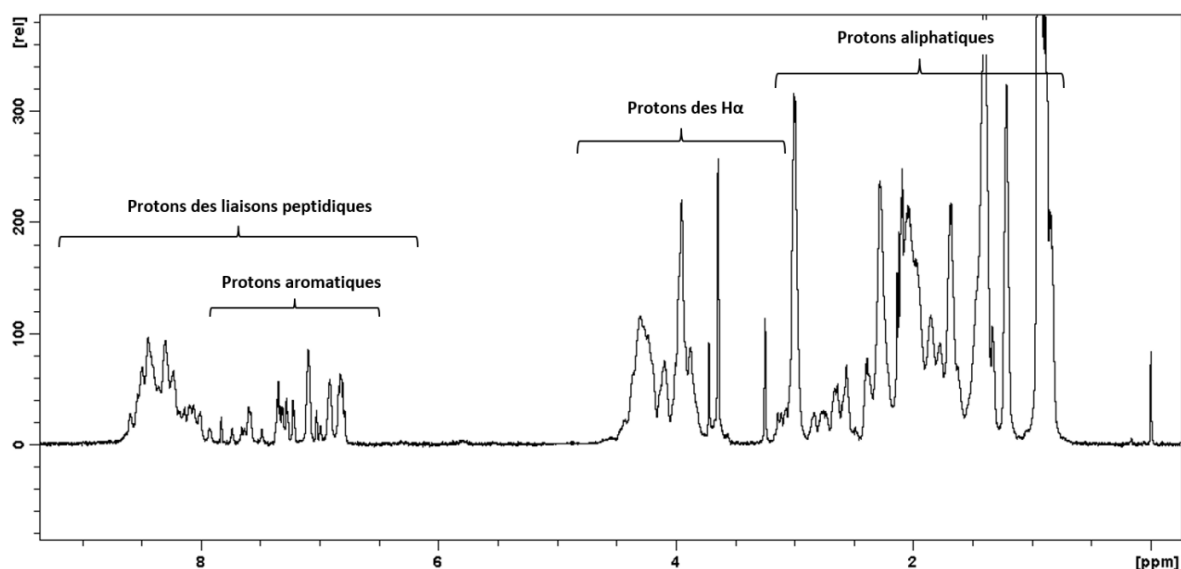


Figure 34 - Spectre RMN ^1H de l' α -synucléine.

Les spectres RMN ont été enregistrés dans tampon phosphate 10 mM (pH 7,4), 50 mM de NaCl et 10% de D_2O . Le pic à 0 ppm correspond au signal du TMS ajouté à l'échantillon.

Nous avons réalisé une titration de l' α -synucléine par des ajouts successifs d' ϵ -viniférine. Nous avons ainsi enregistré les spectres protons de l' α -synucléine avec une concentration croissante d' ϵ -viniférine. Les ratios α -synucléine : E-viniférine sont de 1 :0, 1 :1, 1 :2, 1 :3, 1 :5, 1 :10 et 1 :20. Les figures 35 et 36 illustrent les résultats obtenus.

Une première observation des spectres montre très clairement deux phénomènes :

- l'intensité des pics de la protéine diminue lorsque la concentration d' ϵ -viniférine augmente (Figure 35) ;
- les pics caractéristiques de l' ϵ -viniférine entre 6 et 8 ppm n'apparaissent pas quel que soit la concentration (Figure 36).

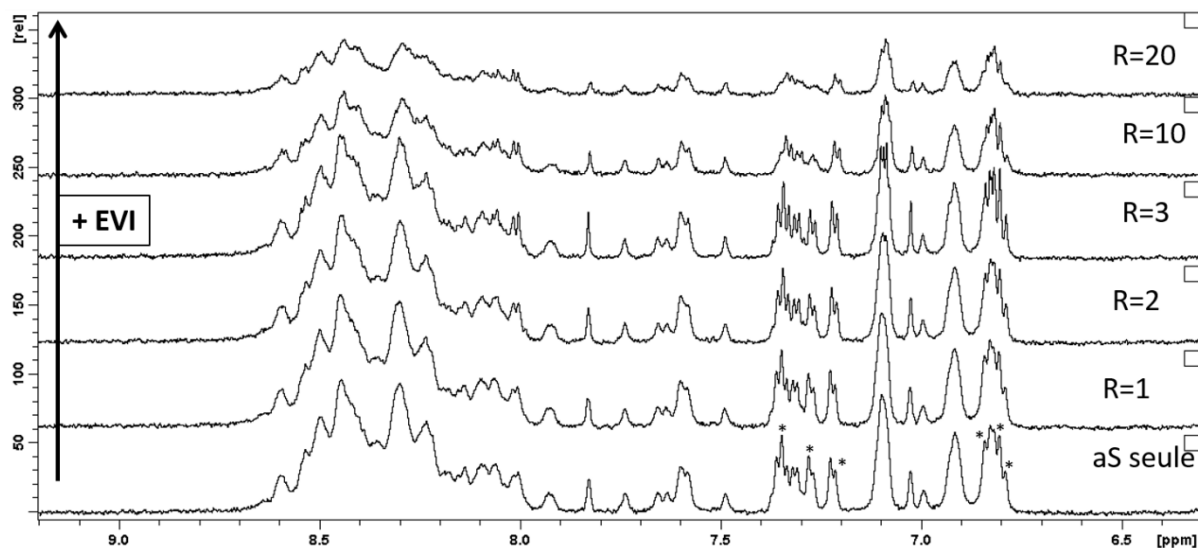


Figure 35 - Spectre RMN ^1H de l' α -synucléine après additions d' ϵ -viniférine

Des additions successives d' ϵ -viniférine sont réalisées sur un échantillon contenant initialement 150 μM d' α -synucléine. Les concentrations d' ϵ -viniférine sont respectivement de 150, 300, 450, 750, 1500 et 3000 μM pour les spectres R1, R2, R3, R5, R10, R20. Les astérisques indiquent les piquet dont nous avons mesuré les variations de déplacements chimiques.

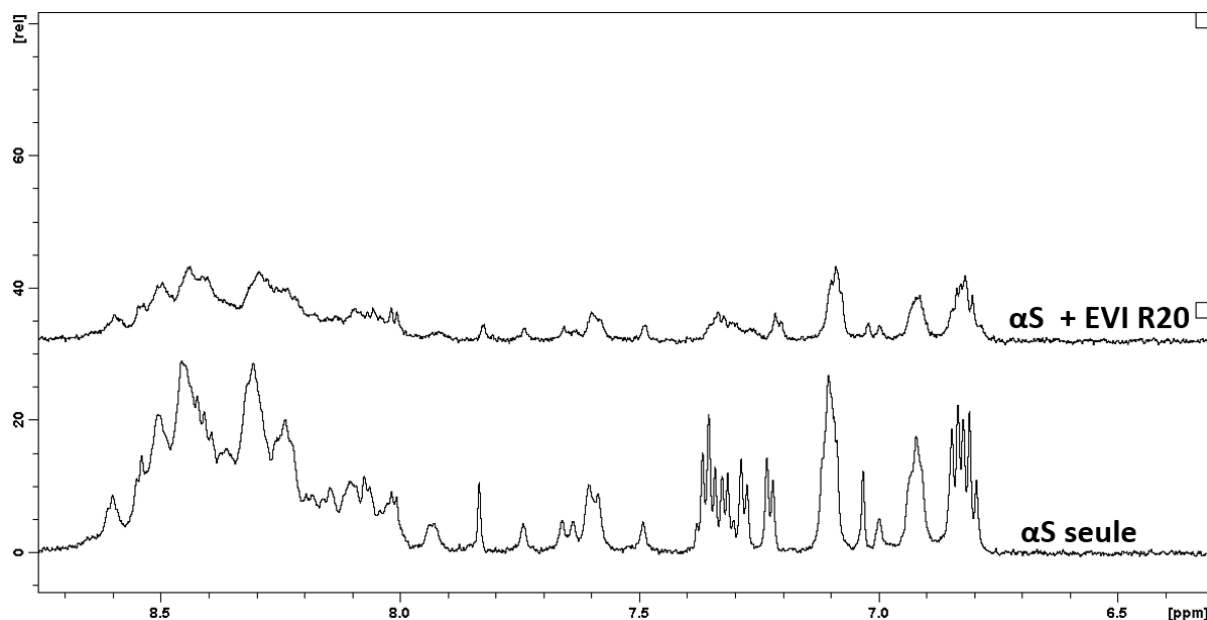


Figure 36 - Affaïssement du spectre RMN ^1H de l' α -synucléine après additions d' ϵ -viniférine.

($[\alpha\text{-synucléine}] = 150 \mu\text{M}$, $[\epsilon\text{-viniférine}] = 3 \text{ mM}$)

Ce phénomène pourrait s'expliquer par une interaction forte entre la protéine et le stilbène. Cette interaction bloquerait la mobilité de la protéine et/ou induirait une précipitation de la protéine en présence de l' ϵ -viniférine. Il est à noter que nous n'avons pas observé de précipitation à l'œil nu dans les tubes.

On constate également que l'ajout progressif d' ϵ -viniférine provoque les déplacements chimiques de certains protons de la protéine comme le montre la figure 37A. L'amplitude de la variation des déplacements chimiques des pics analysés croît jusqu'à atteindre un plateau au ratio 1 : 10 (ϵ -viniférine : synucléine). La formation de ce plateau indique la formation d'un complexe stable en solution entre la protéine et le stilbène (Fernández, Hoyer et al. 2004).

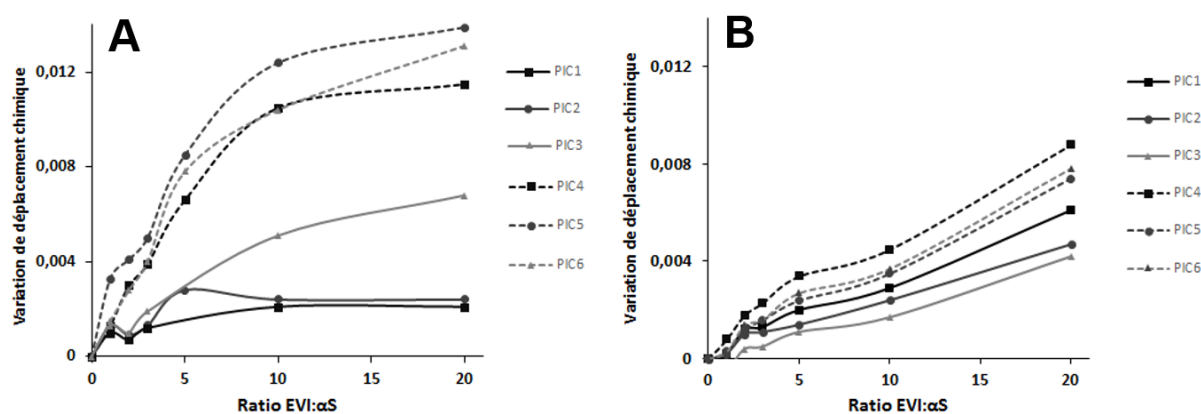


Figure 37 - Variations des déplacements chimiques des protons de la protéine lors de la titration de l' α -synucléine par les stilbènes (ϵ -viniférine (A) et picéatannol (B)).

Pour comprendre, l'effet de la protéine sur les pics de l' ϵ -viniférine, nous avons réalisé une titration de l' ϵ -viniférine par la protéine (Figure 38). Des concentrations croissantes d' α -synucléine ont été ajoutées un échantillon d' ϵ -viniférine. Les résultats obtenus mettent en évidence que le signal de l' ϵ -viniférine est fortement diminué dès un ratio 400 : 1 (ϵ -viniférine : α -synucléine) jusqu'à disparaître pour un ratio de 200 : 1 (ϵ -viniférine : α -synucléine). Cette très forte diminution du signal nous indique que les protons de l' ϵ -viniférine sont écrantés par la protéine.

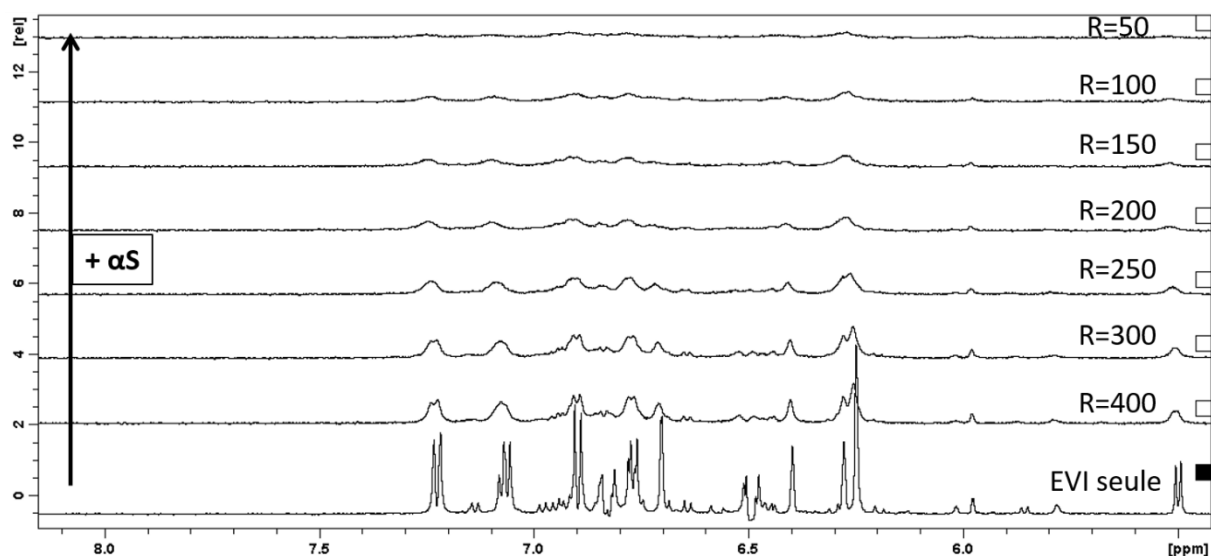


Figure 38 - Spectre ^1H -RMN de l' ϵ -viniférine après addition d' α -synucléine.

Des additions successives d' α -synucléine sont réalisées sur un échantillon contenant initialement 2 mM d' ϵ -viniférine. Les concentrations d' α -synucléine sont respectivement de 5, 6.6, 8, 10, 13.3, 20 et 40 μM pour les spectres R400, R300, R250, R200, R150, R100 et R50.

De la même façon, nous avons réalisé les expériences de titration avec un autre stilbène, le picéatannol. Les ratios sont identiques aux précédents. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 39. Les variations de déplacement chimique des protons de la protéine sont analysées et présentées en figure 37B.

Les résultats obtenus sont très différents de ceux obtenus avec l' ϵ -viniférine. Il est possible d'observer une variation des déplacements chimiques de la protéine (Figure 37B). Ce qui indique une interaction entre le picéatannol et la protéine. Cependant, nous n'observons la formation d'un plateau. De plus, les pics de la protéine ne disparaissent pas après addition de picéatannol. Les pics du picéatannol entre 6,5 et 7,5 ppm apparaissent et augmentent avec la concentration de picéatannol dans l'échantillon. Ces observations indiquent que les mécanismes d'interaction dépendent du stilbène testé. L' ϵ -viniférine et le picéatannol inhibent l'agrégation de façons différentes. Les données de RMN semblent indiquer que l'interaction entre le picéatannol et l' α -synucléine est plus faible que celle avec l' ϵ -viniférine.

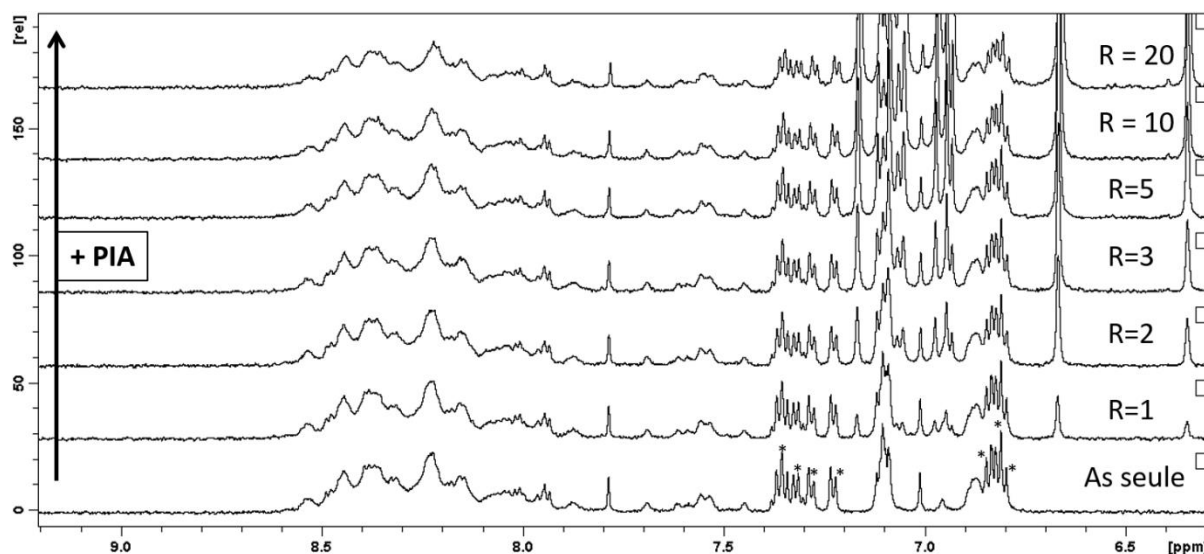


Figure 39 - Spectre RMN ^1H de l' α -synucléine après additions de picétannol.

Des additions successives de picétannol sont réalisées sur un échantillon contenant initialement 150 μM d' α -synucléine. Les concentrations de picétannol sont respectivement de 150, 300, 450, 750, 1500 et 3000 μM pour les spectres R1, R2, R3, R5, R10, R20. Les astérisques indiquent les piquet dont nous avons mesuré les variations de déplacements chimiques.

3 Effet des stilbènes sur la toxicité de l' α -synucléine

Les résultats obtenus par mesure de la fluorescence de la ThT, par microscopie électroniques, nous indiquent que le resvératrol, le picétannol et l' ϵ -viniférine inhibent la formation de fibres d' α -synucléine. Comme indiqué précédemment, l'état d'agrégation de l' α -synucléine influe directement sur la toxicité de celle-ci (Winner, Jappelli et al. 2011). Dans cette partie du travail, nous avons souhaitez vérifier si les stilbènes ont la capacité de réduire la toxicité des agrégats de synucléine.

3.1 Membranes lipidiques modèles

La toxicité induite par l' α -synucléine est principalement due à sa capacité à perturber la structure des membranes par l'intermédiaire de la formation de pores transmembranaires (Auluck, Caraveo et al. 2010). Pour cette raison, nous avons étudié la capacité des stilbènes à

prévenir la perméabilisation membranaire induite par l' α -synucléine sur un modèle de liposome. Les liposomes sont des membranes lipidiques modèles mimant les membranes biologiques. Ce sont des vésicules lipidiques formés d'une bicouche de phospholipides possédant un compartiment aqueux.

Les liposomes préparés au laboratoire sont constitués de POPG, un phospholipide chargé négativement. Ces liposomes ont une incurvation négative et leur cœur hydrophobe serait plus exposés aux agrégats de l' α -synucléine (van Rooijen, Claessens et al. 2009). Lors de la préparation des liposomes, un fluorophore est encapsulé dans le compartiment aqueux à une concentration de « quenching » (concentration bloquant l'émission de fluorescence). En solution, la fluorescence d'une molécule est proportionnelle à sa concentration. Par contre, à très forte concentration, un phénomène de « quenching » va avoir lieu. Ce phénomène a pour origine la collision entre molécules qui favorise l'apparition de transitions non-radiatives. La fluorescence est donc réduite à forte concentration (Andersson, Danielsson et al. 2007). En cas de déstabilisation de la membrane, le fluorophore va diffuser à l'extérieure des liposomes et se diluer. Ce phénomène va induire une augmentation du signal de fluorescence.

Il existe plusieurs fluorophores utilisables pour ce type d'expérience. Ils varient de par leurs tailles et permettent l'estimation de la taille des pores formés (Bonnafeous and Stegmann 2000). Nous avons sélectionné la calcéine car c'est celui de plus petite taille, qui devrait permettre la mesure d'une fuite dès la perturbation de la membrane. De plus gros fluorophores ne peuvent fuir qu'en cas de formation de pores ou de dégâts importants à la membrane.

Nous avons incubé l' α -synucléine en absence ou présence de 100 μ M des différents stilbènes pendant 4 jours. Les liposomes, produits au laboratoire et contenant 70 μ M de calcéine, sont alors exposés aux agrégats formés par l' α -synucléine dans ces conditions (Figures 39). On constate que l' α -synucléine agrégée seule provoque une fuite de calcéine en dehors des liposomes, ce qui correspond à une perturbation membranaire. L'incubation de la protéine en présence de stilbènes permet une diminution de la fuite de calcéine. Le picéatannol, l' ϵ -viniférine, l'ampélopsine A et l'isohopeaphénol réduisent de 30 à 52% la fuite de calcéine en dehors des liposomes. Le resvératrol est le composé le plus actif, il réduit cette fuite de 95%. Les résultats présentés dans la figure 39B mettent par ailleurs en évidence que cette inhibition

de la capacité de l' α -synucléine à déstabiliser les membranes lipidiques varie en fonction de la concentration en stilbène à laquelle la protéine est exposée durant son agrégation.

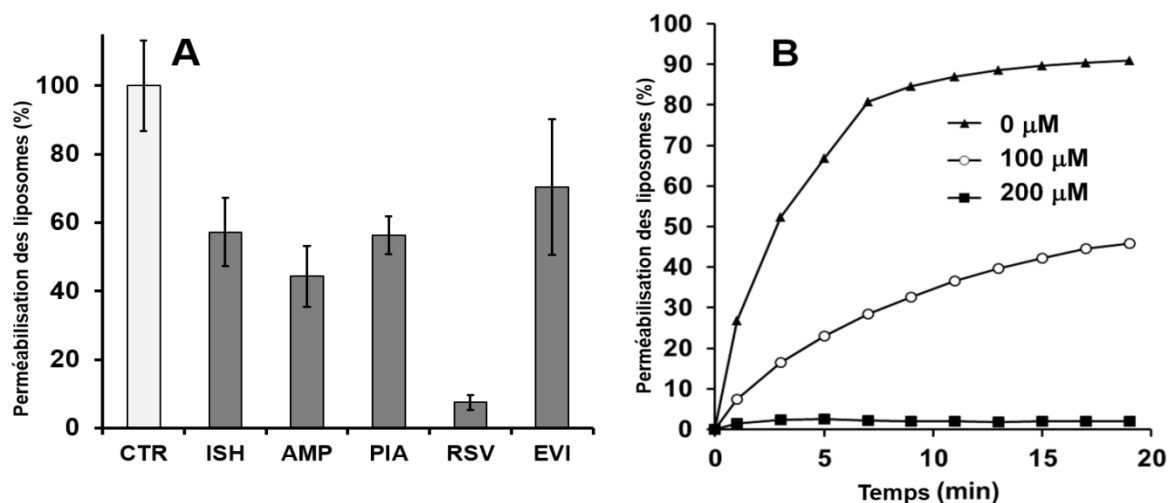


Figure 40 - Fuite de calcéine à travers les membranes perturbées des liposomes
La libération de calcéine est exprimée par rapport à la fuite enregistrée par ajout de Triton X100 10% (100% de fuite, libération de la totalité de la calcéine). Les liposomes sont exposés à 10 μ M d' α -synucléine agrégée seule ou en présence de 100 μ M d'isohéopaphénol (ISH), d'ampélopsine A (AMA), de resvératrol (RSV), de picéatannol (PIA) ou d' ϵ -viniférine (EVI) (A). Les liposomes sont exposés à 10 μ M d' α -synucléine agrégée seule ou en présence de 10 μ M, 100 μ M et 200 μ M de picéatannol (B).

La diminution de la fuite de calcéine peut-être causée par une diminution de la capacité des agrégats formés à perméabiliser les membranes, ou par une baisse de la quantité d'agrégats capable d'induire cette perméabilisation. Les résultats que nous avons obtenus indiquent que les stilbènes préviennent la toxicité induite par l' α -synucléine sur les membranes lipidiques modèles.

3.2 Effets neuroprotecteurs de stilbènes sur des lignées neuronales PC12

Afin de mettre en évidence une activité neuroprotectrice des stilbènes *in cellulo*, nous avons utilisé une lignée tumorale de cellules de phéochromocytome de rat (lignée PC12). La documentation sur ces cellules est abondante et elles sont couramment utilisées pour les

études de neurodégénération (Grau and Greene 2012). Ces cellules miment les cellules dopaminergiques car elles sont capables de synthétiser, de stocker et de sécréter les catécholamines, notamment la dopamine.

Dans notre étude, nous avons mesuré la viabilité des cellules PC12 en présence ou non d' α -synucléine agrégée pendant 2 jours, et en présence des différents stilbènes étudiés. La mesure est réalisée en utilisant un test de viabilité cellulaire MTT. Nous observons sur la figure 40 qu'une concentration de 100 nM d' α -synucléine agrégée induit une diminution du nombre de cellules vivantes de 20 % lorsque celles-ci sont mises en contact pendant 48h avec la protéine. Cette diminution est ensuite proportionnelle à la quantité de la protéine agrégée jusqu'à la concentration de 1 μ M. La toxicité de l' α -synucléine agrégée est ensuite stable jusqu'à 5 μ M, lorsque la viabilité des cellules est de 50%. Nous avons donc choisi pour nos expériences futures d'utiliser la concentration de 500 nM. Des résultats similaires ont été observés dans la littérature (Masuda, Suzuki et al. 2006).

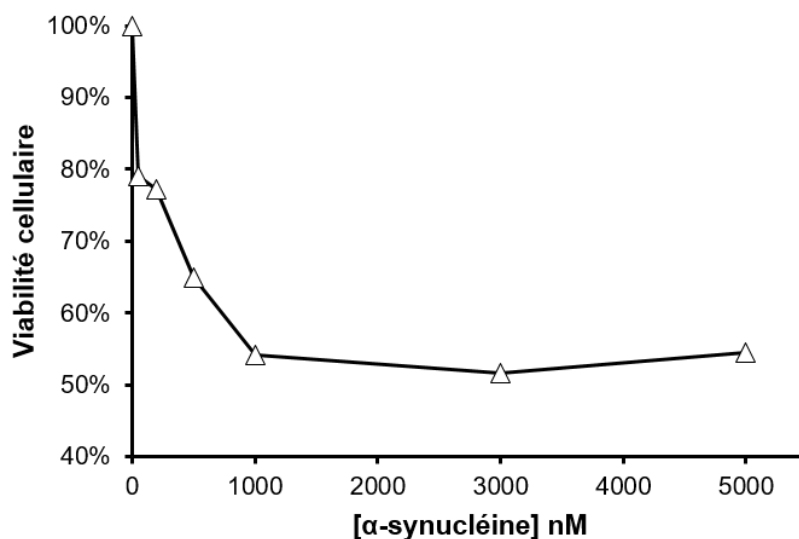


Figure 41 - Viabilité des cellules PC12 en fonction de la concentration d' α -synucléine agrégée
Des cellules PC12 sont incubées 24h en présence de différentes concentrations d' α -synucléine agrégée auparavant pendant 48h.

Nous avons ensuite mis en présence les cellules neuronales en présence des polyphénols seuls afin de mettre en évidence un potentiel effet toxique de ces composés. Nous montrons que l'isohopeaphénol seul présente un effet toxique sur les cellules à 10 et 30 μ M. L' ϵ -viniférine montre également une toxicité à 30 μ M.

Les cellules PC12 sont ensuite mises en présence ou non d' α -synucléine agrégée, et en présence des différents stilbènes. Sur la figure 41, nous observons une diminution de la viabilité de 40% pour les cellules mises en contact avec 500 nM d' α -synucléine seule. Nous montrons que le resvératrol et l'ampélopsine A n'ont pas d'effet significatif sur la viabilité des cellules PC12 en présence d' α -synucléine. Par contre, l'isohopeaphénol, le picéatannol et l' ϵ -viniférine restaurent la viabilité cellulaire. En effet, l'isohopeaphénol restaure significativement la viabilité aux 3 concentrations testées. On observe cependant une chute de la viabilité à 30 μ M causée par la toxicité de l'isohopeaphénol sur les cellules PC12.

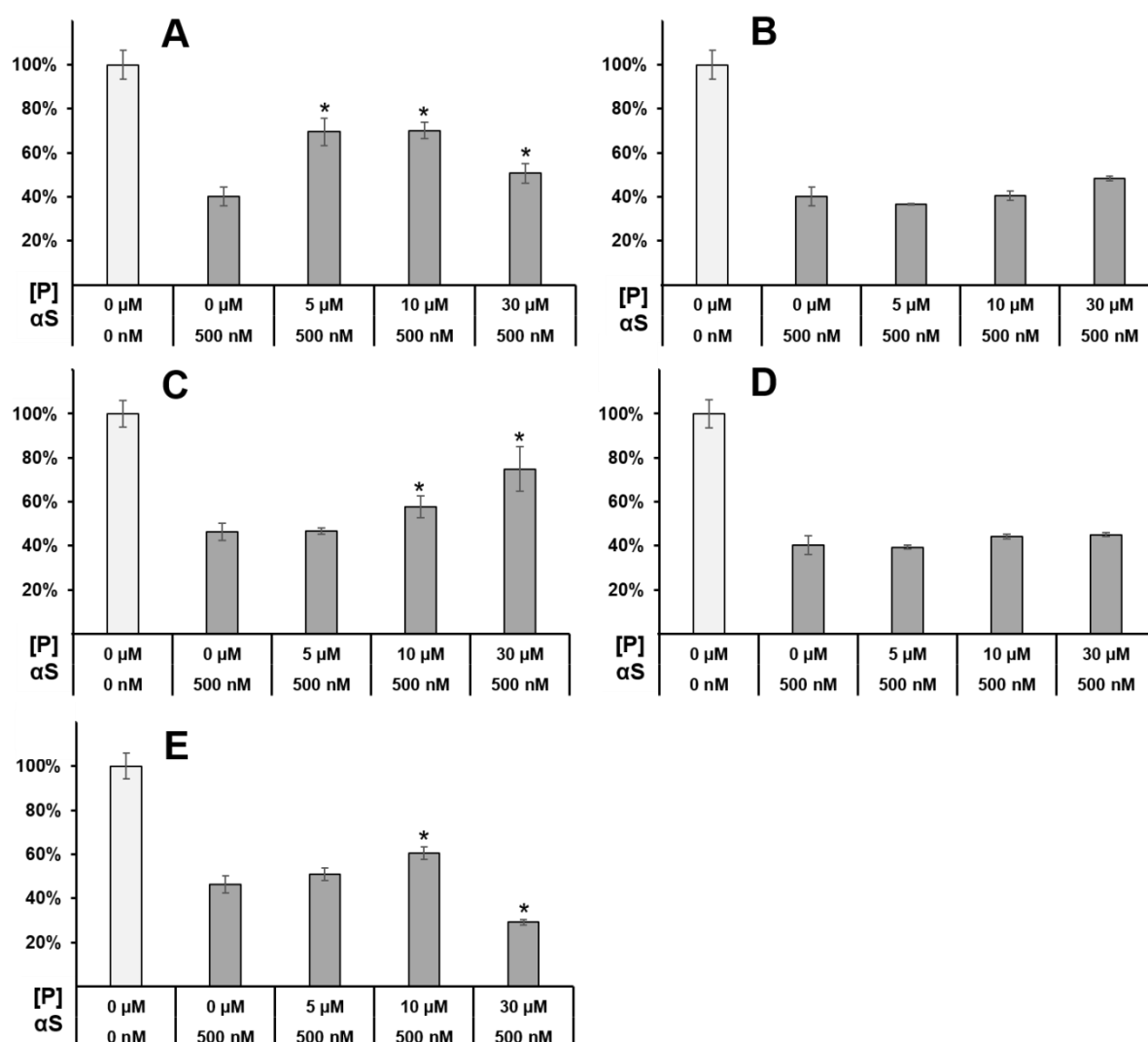


Figure 42 - Restauration de la viabilité cellulaire par les stilbènes

Les cellules PC12 sont incubées 24h après addition de 500 nM d' α -synucléine et différentes concentrations de d'isohopeaphénol (A) ou d'ampélopsine A (B), de picéatannol (C), de resvératrol (D) ou d' ϵ -viniférine (E), (*p < 0,05).

En présence de picéatannol, la viabilité cellulaire est augmentée de 12% à 10 μ M et de 29% à 30 μ M. L' ϵ -viniférine augmente la viabilité de 15% à 10 μ M, en revanche à 30 μ M cette molécule est toxique pour les cellules.

Ainsi ces résultats montrent que l'isohopeaphénol, le picéatannol et l' ϵ -viniférine sont capables d'inhiber la toxicité induite par l' α -synucléine. Dans ces conditions, l' α -synucléine perd sa capacité à provoquer la mort des neurones PC12. Au vu des différents résultats obtenus, nous supposons que la cytoprotection des stilbènes est due à leur capacité à diminuer la concentration de protofibrilles d' α -synucléine, forme toxique pour les cellules PC12. En effet, nous avons montré précédemment à l'aide de la MET que ces composés sont capables de déstructurer rapidement des fibrilles matures, conduisant ainsi à la formations d'oligomères non toxiques. De façon indirecte, ces stilbènes pourraient donc inhiber les effets de d' α -synucléine agrégée sur les cellules neuronales, comme la production de ROS, la dépolarisation de la membrane mitochondriale, mais également l'apoptose (Liu, Yu et al. 2011). Par exemple, Smith et ses collaborateurs ont ainsi mis en évidence que la curcumine est capable de rétablir la viabilité cellulaire et de prévenir la toxicité induite par l' α -synucléine sur la lignée PC12. Ce polyphénol inhibe également la production de ROS, protégeant donc les cellules contre les dommages tels que la peroxydation des lipides, la détérioration des protéines et de l'ADN. De plus, la curcumine est capable d'inhiber la dépolarisation de la membrane induite par la protéine ainsi que le relargage de caspases (Smith, Jiang et al. 2005)

Conclusion

Conclusion et Perspectives

Il a déjà été démontré que certains composés phénoliques ont la capacité de se lier à l' α -synucléine et d'empêcher la formation de fibrilles ainsi que la déstabilisation de fibrilles matures déjà formés (Zhu, Rajamani et al. 2004, Ono and Yamada 2006, Ehrnhoefer, Bieschke et al. 2008). Les travaux présentés dans cet ouvrage ont permis de montrer que certains stilbènes ont la capacité d'inhiber l'agrégation de l' α -synucléine, une protéine dont l'agrégation en protofibrilles est fortement impliquée dans la mort des neurones dopaminergiques. Les stilbènes sélectionnés pour nos expériences sont représentatifs de la variété des structures des dérivés du resvératrol.

Les expériences par mesure de la fluorescence de la ThT et par microscopie électronique ont mis en évidence que les stilbènes, et en particulier le resvératrol, le picéatannol et l' ϵ -viniférine, inhibent l'agrégation de l' α -synucléine. Ces mêmes techniques ont également permis de montrer que ces stilbènes sont capables de déstabiliser des fibrilles matures.

Les résultats obtenus par SDS-PAGE indiqueraient que le resvératrol et le picéatannol inhibent la formation d'espèces insolubles en solution. De plus, ils favoriseraient la production de petits oligomères solubles formés par l'interaction des stilbènes avec l' α -synucléine. Les expériences de dichroïsme circulaire réalisées avec l' ϵ -viniférine confirment que ce stilbène inhibe l'agrégation de la protéine. Les résultats obtenus montrent que ce composé bloque le changement de conformation en feuillets β indispensable à la polymérisation de la protéine. Enfin les expériences de RMN montrent que les mécanismes d'interaction diffèrent en fonction du stilbène étudié. Des expériences complémentaires seront nécessaires pour comprendre ces mécanismes d'interaction. Par exemple, l'étude de l'interaction par RMN entre l' ϵ -viniférine et l' α -synucléine a mis en évidence que ce stilbène interagit avec la protéine au niveau de plusieurs résidus de la protéine. Pour identifier ces sites d'interaction des expériences de RMN bidimensionnelle seront nécessaires avec une protéine marquée.

Les travaux réalisés montrent également que les stilbènes utilisés pourraient prévenir la toxicité induite par l'agrégation de l' α -synucléine. Nous avons pu démontrer que ces molécules, et en particulier le resvératrol, préviennent la formation d'agrégats d' α -synucléine capables de perméabiliser des membranes lipidiques modèles. Sachant que seules les

protofibrilles sont aptes à endommager les membranes, notre hypothèse est que les stilbènes favorisent la formation d'oligomères non toxiques, en lieu de la formation de protofibrilles ou de fibrilles. Enfin, la mesure de la viabilité de cellules PC12 exposés à l' α -synucléine agrégée nous a permis de démontrer que l'addition de stilbènes aux cellules PC12 pouvait inhiber la mort induite par ces agrégats.

Les travaux de cette thèse démontrent que certains stilbènes comme le resvératrol, le picéatannol ou l' ϵ -viniférine pourraient avoir un effet préventif sur la maladie de Parkinson. Ces résultats apportent des éléments d'informations concrets pour participer à l'identification et/ou au design de composés thérapeutiques pouvant lutter contre la MP. Cependant des travaux supplémentaires restent à réaliser pour mieux comprendre les mécanismes mis en jeu. De plus deux étapes clés restent à étudier : l'étude de la biodisponibilité et les effets *in vivo* des composés. La biodisponibilité des stilbènes et en particulier leur capacité à franchir la BHE reste à étudier. Des travaux sont en cours dans notre laboratoire concernant la biodisponibilité des oligomères de resvératrol et leurs effets neuroprotecteurs *in vivo*.

Références

- Acevedo De la Cruz, A., G. Hilbert, C. Rivière, V. Mengin, N. Ollat, L. Bordenave, S. Decroocq, J.-C. Delaunay, S. Delrot, J.-M. Mérillon, J.-P. Monti, E. Gomès and T. Richard (2012). "Anthocyanin identification and composition of wild *Vitis* spp. accessions by using LC–MS and LC–NMR." *Analytica Chimica Acta* **732**: 145-152.
- Amor, S., F. Puentes, D. Baker and P. van der Valk (2010). "Inflammation in neurodegenerative diseases." *Immunology* **129**(2): 154-169.
- Andersson, A., J. Danielsson, A. Gräslund and L. Måler (2007). "Kinetic models for peptide-induced leakage from vesicles and cells." *European Biophysics Journal* **36**(6): 621-635.
- Apetri, M. M., N. C. Maiti, M. G. Zagorski, P. R. Carey and V. E. Anderson (2006). "Secondary Structure of α -Synuclein Oligomers: Characterization by Raman and Atomic Force Microscopy." *Journal of Molecular Biology* **355**(1): 63-71.
- Ashikawa, K., S. Majumdar, S. Banerjee, A. C. Bharti, S. Shishodia and B. B. Aggarwal (2002). "Piceatannol Inhibits TNF-Induced NF- κ B Activation and NF- κ B-Mediated Gene Expression Through Suppression of I κ B α Kinase and p65 Phosphorylation." *The Journal of Immunology* **169**(11): 6490-6497.
- Auluck, P. K., G. Caraveo and S. Lindquist (2010). " α -Synuclein: Membrane Interactions and Toxicity in Parkinson's Disease." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **26**(1): 211-233.
- Bartels, T., J. G. Choi and D. J. Selkoe (2011). "[α]-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation." *Nature* **477**(7362): 107-110.
- Baydar, N. G., O. Sagdic, G. Ozkan and S. Cetin (2006). "Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera* L.) seed extracts." *International Journal of Food Science & Technology* **41**(7): 799-804.
- Berrocal, R., P. Vasudevaraju, S. S. Indi, K. R. S. Sambasiva Rao and K. S. Rao (2014). "In vitro evidence that an aqueous extract of *Centella asiatica* modulates α -Synuclein aggregation dynamics." *Journal of Alzheimer's Disease* **39**(2): 457-465.
- Bertelli, A., A. A. E. Bertelli, A. Gozzini and L. Giovannini (1998). "Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity." *Drugs under Experimental and Clinical Research* **24**(3): 133-138.
- Bhullar, K. S. and H. P. V. Rupasinghe (2013). "Polyphenols: Multipotent Therapeutic Agents in Neurodegenerative Diseases." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2013**: 18.
- Biancalana, M. and S. Koide (2010). "Molecular Mechanism of Thioflavin-T Binding to Amyloid Fibrils." *Biochimica et biophysica acta* **1804**(7): 1405-1412.

- Bieschke, J., J. Russ, R. P. Friedrich, D. E. Ehrnhoefer, H. Wobst, K. Neugebauer and E. E. Wanker (2010). "EGCG remodels mature α -synuclein and amyloid- β fibrils and reduces cellular toxicity." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(17): 7710-7715.
- Billard, C., J.-C. Izard, V. Roman, C. Kern, C. Mathiot, F. Mentz and J.-P. Kolb (2002). "Comparative Antiproliferative and Apoptotic Effects of Resveratrol, ϵ -viniferin and Vine-shots Derived Polyphenols (Vineatrols) on Chronic B Lymphocytic Leukemia Cells and Normal Human Lymphocytes." Leukemia & Lymphoma **43**(10): 1991-2002.
- Block, M. L., L. Zecca and J.-S. Hong (2007). "Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms." Nat Rev Neurosci **8**(1): 57-69.
- Bonafous, P. and T. Stegmann (2000). "Membrane Perturbation and Fusion Pore Formation in Influenza Hemagglutinin-mediated Membrane Fusion: A NEW MODEL FOR FUSION." Journal of Biological Chemistry **275**(9): 6160-6166.
- Boocock, D. J., K. R. Patel, G. E. S. Faust, D. P. Normolle, T. H. Marczylo, J. A. Crowell, D. E. Brenner, T. D. Booth, A. Gescher and W. P. Steward (2007). "Quantitation of trans-resveratrol and detection of its metabolites in human plasma and urine by high performance liquid chromatography." Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences **848**(2): 182-187.
- Braak, H., E. Ghebremedhin, U. Rüb, H. Bratzke and K. Del Tredici (2004). "Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology." Cell and Tissue Research **318**(1): 121-134.
- Brat, P., S. Georgé, A. Bellamy, L. D. Chaffaut, A. Scalbert, L. Mennen, N. Arnault and M. J. Amiot (2006). "Daily Polyphenol Intake in France from Fruit and Vegetables." The Journal of Nutrition **136**(9): 2368-2373.
- Breydo, L., J. W. Wu and V. N. Uversky (2012). " α -Synuclein misfolding and Parkinson's disease." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease **1822**(2): 261-285.
- Brown, T. P., P. C. Rumsby, A. C. Capleton, L. Rushton and L. S. Levy (2006). "Pesticides and Parkinson's Disease—Is There a Link?" Environmental Health Perspectives **114**(2): 156-164.
- Burkon, A. and V. Somoza (2008). "Quantification of free and protein-bound trans-resveratrol metabolites and identification of trans-resveratrol-C/O-conjugated diglucuronides – Two novel resveratrol metabolites in human plasma." Molecular Nutrition & Food Research **52**(5): 549-557.
- Burns, J., T. Yokota, H. Ashihara, M. E. J. Lean and A. Crozier (2002). "Plant Foods and Herbal Sources of Resveratrol." Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(11): 3337-3340.
- Burré, J., S. Vivona, J. Diao, M. Sharma, A. T. Brunger and T. C. Südhof (2013). "Properties of Native Brain α -Synuclein." Nature **498**(7453): E4-E7.

Bussell Jr, R. and D. Eliezer (2003). "A Structural and Functional Role for 11-mer Repeats in α -Synuclein and Other Exchangeable Lipid Binding Proteins." Journal of Molecular Biology **329**(4): 763-778.

Cabin, D. E., K. Shimazu, D. Murphy, N. B. Cole, W. Gottschalk, K. L. McIlwain, B. Orrison, A. Chen, C. E. Ellis, R. Paylor, B. Lu and R. L. Nussbaum (2002). "Synaptic Vesicle Depletion Correlates with Attenuated Synaptic Responses to Prolonged Repetitive Stimulation in Mice Lacking α -Synuclein." The Journal of Neuroscience **22**(20): 8797-8807.

Cappai, R., S.-L. Leck, D. J. Tew, N. A. Williamson, D. P. Smith, D. Galatis, R. A. Sharples, C. C. Curtain, F. E. Ali, R. A. Cherny, J. G. Culvenor, S. P. Bottomley, C. L. Masters, K. J. Barnham and A. F. Hill (2005). "Dopamine promotes α -synuclein aggregation into SDS-resistant soluble oligomers via a distinct folding pathway." The FASEB Journal.

Caruana, M., T. Högen, J. Levin, A. Hillmer, A. Giese and N. Vassallo (2011). "Inhibition and disaggregation of α -synuclein oligomers by natural polyphenolic compounds." FEBS Letters **585**(8): 1113-1120.

Chalal, M., D. Delmas, P. Meunier, N. Latruffe and D. Vervandier-Fasseur (2014). "Inhibition of Cancer Derived Cell Lines Proliferation by Synthesized Hydroxylated Stilbenes and New Ferrocenyl-Stilbene Analogs. Comparison with Resveratrol." Molecules **19**(6): 7850.

Cheruvara, H., V. L. Allen-Baume, N. M. Kad and J. M. Mason (2015). "Intracellular screening of a peptide library to derive a potent peptide inhibitor of α -synuclein aggregation." Journal of Biological Chemistry.

Chin-Chan, M., J. Navarro-Yepes and B. Quintanilla-Vega (2015). "Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases." Frontiers in Cellular Neuroscience **9**: 124.

Chong, J., A. Poutaraud and P. Hugueney (2009). "Metabolism and roles of stilbenes in plants." Plant Science **177**(3): 143-155.

Chowdhury, S. A., K. Kishino, R. I. E. Satoh, K. E. N. Hashimoto, H. Kikuchi, H. Nishikawa, Y. Shirataki and H. Sakagami (2005). "Tumor-specificity and Apoptosis-inducing Activity of Stilbenes and Flavonoids." Anticancer Research **25**(3B): 2055-2063.

Clayton, D. F. and J. M. George (1998). "The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease." Trends in Neurosciences **21**(6): 249-254.

Conway, K. A., S.-J. Lee, J.-C. Rochet, T. T. Ding, R. E. Williamson and P. T. Lansbury (2000). "Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both α -synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: Implications for pathogenesis and therapy." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(2): 571-576.

Coon, S., A. Stark, E. Peterson, A. Gloi, G. Kortsha, J. Pounds, D. Chettle and J. Gorell (2006). "Whole-Body Lifetime Occupational Lead Exposure and Risk of Parkinson's Disease." Environmental Health Perspectives **114**(12): 1872-1876.

- Corti, O., S. Lesage and A. Brice (2011). "What Genetics Tells us About the Causes and Mechanisms of Parkinson's Disease." Physiological Reviews **91**(4): 1161-1218.
- D'Archivio, M., C. Filesi, R. Di Benedetto, R. Gargiulo, C. Giovannini and R. Masella (2007). "Polyphenols, dietary sources and bioavailability." Annali dell'Istituto Superiore di Sanita **43**(4): 348-361.
- Davidson, W. S., A. Jonas, D. F. Clayton and J. M. George (1998). "Stabilization of α -Synuclein Secondary Structure upon Binding to Synthetic Membranes." Journal of Biological Chemistry **273**(16): 9443-9449.
- DeWitt, D. C. and E. Rhoades (2013). " α -Synuclein Can Inhibit SNARE-mediated Vesicle Fusion Through Direct Interactions with Lipid Bilayers." Biochemistry **52**(14): 2385-2387.
- Di Fonzo, A., C. F. Rohé, J. Ferreira, H. F. Chien, L. Vacca, F. Stocchi, L. Guedes, E. Fabrizio, M. Manfredi, N. Vanacore, S. Goldwurm, G. Breedveld, C. Sampaio, G. Meco, E. Barbosa, B. A. Oostra and V. Bonifati (2005). "A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease." The Lancet **365**(9457): 412-415.
- Dickson, D. W. (2004). "Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect?" Journal of Clinical Investigation **114**(1): 23-27.
- Dikiy, I. and D. Eliezer (2012). "Folding and misfolding of alpha-synuclein on membranes." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1818**(4): 1013-1018.
- Ehrnhoefer, D. E., J. Bieschke, A. Boeddrich, M. Herbst, L. Masino, R. Lurz, S. Engemann, A. Pastore and E. E. Wanker (2008). "EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers." Nat Struct Mol Biol **15**(6): 558-566.
- Eliezer, D., E. Kutluay, R. Bussell Jr and G. Browne (2001). "Conformational properties of α -synuclein in its free and lipid-associated states1." Journal of Molecular Biology **307**(4): 1061-1073.
- Fearnley, J. M. and A. J. Lees (1991). AGEING AND PARKINSON'S DISEASE: SUBSTANTIA NIGRA REGIONAL SELECTIVITY.
- Fernández, C. O., W. Hoyer, M. Zweckstetter, E. A. Jares-Erijman, V. Subramaniam, C. Griesinger and T. M. Jovin (2004). "NMR of α -synuclein-polyamine complexes elucidates the mechanism and kinetics of induced aggregation." The EMBO Journal **23**(10): 2039-2046.
- Flamini, R., F. Mattivi, M. Rosso, P. Arapitsas and L. Bavaresco (2013). "Advanced Knowledge of Three Important Classes of Grape Phenolics: Anthocyanins, Stilbenes and Flavonols." International Journal of Molecular Sciences **14**(10): 19651.
- Fleming, L., J. B. Mann, J. Bean, T. Briggles and J. R. Sanchez-Ramos (1994). "Parkinson's disease and brain levels of organochlorine pesticides." Annals of Neurology **36**(1): 100-103.
- Fuchs, J., C. Nilsson, J. Kachergus, M. Munz, E.-M. Larsson, B. Schüle, J. W. Langston, F. A. Middleton, O. A. Ross, M. Hulihan, T. Gasser and M. J. Farrer (2007). "Phenotypic variation in a large Swedish pedigree due to SNCA duplication and triplication." Neurology.

- Gao, H.-M., J. Jiang, B. Wilson, W. Zhang, J.-S. Hong and B. Liu (2002). "Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease." Journal of Neurochemistry **81**(6): 1285-1297.
- Gao, H.-M., P. T. Kotzbauer, K. Uryu, S. Leight, J. Q. Trojanowski and V. M.-Y. Lee (2008). "Neuroinflammation and Oxidation/Nitration of α -Synuclein Linked to Dopaminergic Neurodegeneration." The Journal of Neuroscience **28**(30): 7687-7698.
- Geahlen, R. L. and J. L. McLaughlin (1989). "Piceatannol (3,4,3',5'-tetrahydroxy-trans-stilbene) is a naturally occurring protein-tyrosine kinase inhibitor." Biochemical and Biophysical Research Communications **165**(1): 241-245.
- Gelb, D. J., E. Oliver and S. Gilman (1999). "Diagnostic criteria for parkinson disease." Archives of Neurology **56**(1): 33-39.
- Giehm, L. and D. E. Otzen (2010). "Strategies to increase the reproducibility of protein fibrillization in plate reader assays." Analytical Biochemistry **400**(2): 270-281.
- Gilks, W. P., P. M. Abou-Sleiman, S. Gandhi, S. Jain, A. Singleton, A. J. Lees, K. Shaw, K. P. Bhatia, V. Bonifati, N. P. Quinn, J. Lynch, D. G. Healy, J. L. Holton, T. Revesz and N. W. Wood (2005). "A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease." The Lancet **365**(9457): 415-416.
- Grau, C. M. and L. A. Greene (2012). "Use of PC12 Cells and Rat Superior Cervical Ganglion Sympathetic Neurons as Models for Neuroprotective Assays Relevant to Parkinson's Disease." Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) **846**: 201-211.
- Griffioen, G., H. Duhamel, N. Van Damme, K. Pellens, P. Zabrocki, C. Pannecouque, F. van Leuven, J. Winderickx and S. Wera (2006). "A yeast-based model of α -synucleinopathy identifies compounds with therapeutic potential." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease **1762**(3): 312-318.
- Guardia-Laguarta, C., E. Area-Gomez, C. Rüb, Y. Liu, J. Magrané, D. Becker, W. Voos, E. A. Schon and S. Przedborski (2014). " α -Synuclein Is Localized to Mitochondria-Associated ER Membranes." The Journal of Neuroscience **34**(1): 249-259.
- Guerrero, R. F., M. C. García-Parrilla, B. Puertas and E. Cantos-Villar (2009). "Wine, resveratrol and health: A review." Natural Product Communications **4**(5): 635-658.
- Hanisch, U.-K. (2002). "Microglia as a source and target of cytokines." Glia **40**(2): 140-155.
- Hardy, J. and D. J. Selkoe (2002). "The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics." Science **297**(5580): 353-356.
- He, S. and X. Yan (2013). "From resveratrol to its derivatives: New sources of natural antioxidant." Current Medicinal Chemistry **20**(8): 1005-1017.
- Hilbert, G., H. Temsamani, L. Bordenave, E. Pedrot, N. Chaher, S. Cluzet, J.-C. Delaunay, N. Ollat, S. Delrot, J.-M. Mérellon, E. Gomès and T. Richard (2015). "Flavonol profiles in

berries of wild *Vitis* accessions using liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectrometry." Food Chemistry **169**: 49-58.

Hochstrasser, H., J. Tomiuk, U. Walter, S. Behnke, J. Spiegel, R. Krüger, G. Becker, O. Riess and D. Berg (2005). "Functional relevance of ceruloplasmin mutations in Parkinson's Disease." The FASEB Journal.

Holdorff, B., A. Rodrigues e Silva and R. Dodel (2013). "Centenary of Lewy bodies (1912–2012)." Journal of Neural Transmission **120**(4): 509-516.

Hong, D.-P., W. Xiong, J.-Y. Chang and C. Jiang (2011). "The role of the C-terminus of human α -synuclein: Intra-disulfide bonds between the C-terminus and other regions stabilize non-fibrillar monomeric isomers." FEBS Letters **585**(3): 561-566.

Hudson, S. A., H. Ecroyd, T. W. Kee and J. A. Carver (2009). "The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds." FEBS Journal **276**(20): 5960-5972.

Hung, L.-M., J.-K. Chen, R.-S. Lee, H.-C. Liang and M.-J. Su (2001). "Beneficial effects of astringinin, a resveratrol analogue, on the ischemia and reperfusion damage in rat heart." Free Radical Biology and Medicine **30**(8): 877-883.

Ito, T., Y. Akao, H. Yi, K. Ohguchi, K. Matsumoto, T. Tanaka, M. Iinuma and Y. Nozawa (2003). "Antitumor effect of resveratrol oligomers against human cancer cell lines and the molecular mechanism of apoptosis induced by vaticanol C." Carcinogenesis **24**(9): 1489-1497.

Iwai, A., M. Yoshimoto, E. Masliah and T. Saitoh (1995). "Non-A β . Component of Alzheimer's Disease Amyloid (NAC) is Amyloidogenic." Biochemistry **34**(32): 10139-10145.

Jandera, P., V. Škeříková, L. Řehová, T. Hájek, L. Baldriánová, G. Škopová, V. Kellner and A. Horna (2005). "RP-HPLC analysis of phenolic compounds and flavonoids in beverages and plant extracts using a CoulArray detector." Journal of Separation Science **28**(9-10): 1005-1022.

Jang, J.-H. and Y.-J. Surh (2003). "Protective effect of resveratrol on β -amyloid-induced oxidative PC12 cell death." Free Radical Biology and Medicine **34**(8): 1100-1110.

Janle, E. M., M. A. Lila, M. Grannan, L. Wood, A. Higgins, G. G. Yousef, R. B. Rogers, H. Kim, G. S. Jackson, L. Ho and C. M. Weaver (2010). "Pharmacokinetics and Tissue Distribution of (14)C-Labeled Grape Polyphenols in the Periphery and the Central Nervous System Following Oral Administration." Journal of Medicinal Food **13**(4): 926-933.

Jeandet, P., C. Clément, E. Courot and S. Cordelier (2013). "Modulation of Phytoalexin Biosynthesis in Engineered Plants for Disease Resistance." International Journal of Molecular Sciences **14**(7): 14136-14170.

Jeandet, P., A.-C. Douillet-Breuil, R. Bessis, S. Debord, M. Sbaghi and M. Adrian (2002). "Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, Phytoalexin Gene Expression in Transgenic

Plants, Antifungal Activity, and Metabolism." Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(10): 2731-2741.

Jones, R. (2010). "The Roles of PINK1 and Parkin in Parkinson's Disease." PLoS Biology **8**(1): e1000299.

Kahle, P. J., M. Neumann, L. Ozmen, V. Müller, H. Jacobsen, W. Spooren, B. Fuss, B. Mallon, W. B. Macklin, H. Fujiwara, M. Hasegawa, T. Iwatsubo, H. A. Kretschmar and C. Haass (2002). "Hyperphosphorylation and insolubility of α -synuclein in transgenic mouse oligodendrocytes." EMBO Reports **3**(6): 583-588.

Kamel, F., C. Tanner, D. Umbach, J. Hoppin, M. Alavanja, A. Blair, K. Comyns, S. Goldman, M. Korell, J. Langston, G. Ross and D. Sandler (2007). "Pesticide Exposure and Self-reported Parkinson's Disease in the Agricultural Health Study." American Journal of Epidemiology **165**(4): 364-374.

Kendall H. Lee, Su-Youne Chang, David W. Roberts and Uhnoh Kim (2004). "Neurotransmitter release from high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus." Journal of Neurosurgery **101**(3): 511-517.

Kimura, Y., K. Baba and H. Okuda (2000). "Inhibitory effects of active substances isolated from *Cassia garrettiana* heartwood on tumor growth and lung metastasis in Lewis lung carcinoma-bearing mice (part 2)." Anticancer Research **20**(5): 2923-2930.

Kitazawa, M., V. Anantharam and A. G. Kanthasamy (2001). "Dieldrin-induced oxidative stress and neurochemical changes contribute to apoptotic cell death in dopaminergic cells." Free Radical Biology and Medicine **31**(11): 1473-1485.

Klein, C. and A. Westenberger (2012). "Genetics of Parkinson's Disease." Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine **2**(1): a008888.

Ko, S., S. Lee and W. Whang (1999). "Anti-platelet aggregation activity of stilbene derivatives from *Rheum undulatum*." Archives of Pharmacal Research **22**(4): 401-403.

Kowal, S. L., T. M. Dall, R. Chakrabarti, M. V. Storm and A. Jain (2013). "The current and projected economic burden of Parkinson's disease in the United States." Movement Disorders **28**(3): 311-318.

Kraft, A. D. and G. J. Harry (2011). "Features of Microglia and Neuroinflammation Relevant to Environmental Exposure and Neurotoxicity." International Journal of Environmental Research and Public Health **8**(7): 2980-3018.

Kruger, R., W. Kuhn, T. Muller, D. Woitalla, M. Graeber, S. Kosel, H. Przuntek, J. T. Epplen, L. Schols and O. Riess (1998). "AlaSOPro mutation in the gene encoding [alpha]-synuclein in Parkinson's disease." Nat Genet **18**(2): 106-108.

Kuhn, W., R. Winkel, D. Woitalla, S. Meves, H. Przuntek and T. Muller (1998). "High prevalence of parkinsonism after occupational exposure to lead-sulfate batteries." Neurology **50**(6): 1885-1886.

Lashuel, H. A., C. R. Overk, A. Oueslati and E. Masliah (2013). "The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target." Nature reviews. Neuroscience **14**(1): 38-48.

Lashuel, H. A., B. M. Petre, J. Wall, M. Simon, R. J. Nowak, T. Walz and P. T. Lansbury Jr (2002). " α -Synuclein, Especially the Parkinson's Disease-associated Mutants, Forms Pore-like Annular and Tubular Protofibrils." Journal of Molecular Biology **322**(5): 1089-1102.

Lavedan, C., S. Buchholtz, G. Auburger, R. L. Albin, A. Athanassiadou, J. Blancato, J. A. Burguera, R. E. Ferrell, V. Kostic, E. Leroy, B. Leube, L. Mota-Vieira, T. Papapetropoulos, M. A. Pericak-Vance, J. Pinkus, W. K. Scott, G. Ulm, J. Vasconcelos, J. J. Vilchez, R. L. Nussbaum and M. H. Polymeropoulos (1998). "Absence of Mutation in the β - and γ -Synuclein Genes in Familial Autosomal Dominant Parkinson's Disease." DNA Research **5**(6): 401-402.

LeWitt, P. A. (2008). "Levodopa for the Treatment of Parkinson's Disease." New England Journal of Medicine **359**(23): 2468-2476.

Liang, Z., Y. Yang, L. Cheng and G.-Y. Zhong (2012). "Polyphenolic composition and content in the ripe berries of wild Vitis species." Food Chemistry **132**(2): 730-738.

Lill, C. M., J. T. Roehr, M. B. McQueen, F. K. Kavvoura, S. Bagade, B.-M. M. Schjeide, L. M. Schjeide, E. Meissner, U. Zauft, N. C. Allen, T. Liu, M. Schilling, K. J. Anderson, G. Beecham, D. Berg, J. M. Biernacka, A. Brice, A. L. DeStefano, C. B. Do, N. Eriksson, S. A. Factor, M. J. Farrer, T. Foroud, T. Gasser, T. Hamza, J. A. Hardy, P. Heutink, E. M. Hill-Burns, C. Klein, J. C. Latourelle, D. M. Maraganore, E. R. Martin, M. Martinez, R. H. Myers, M. A. Nalls, N. Pankratz, H. Payami, W. Satake, W. K. Scott, M. Sharma, A. B. Singleton, K. Stefansson, T. Toda, J. Y. Tung, J. Vance, N. W. Wood, C. P. Zabetian, T. G. E. o. P. s. D. C. andMe, C. The International Parkinson's Disease Genomics, G. C. The Parkinson's Disease, C. The Wellcome Trust Case Control, P. Young, R. E. Tanzi, M. J. Khoury, F. Zipp, H. Lehrach, J. P. A. Ioannidis and L. Bertram (2012). "Comprehensive Research Synopsis and Systematic Meta-Analyses in Parkinson's Disease Genetics: The PDGene Database." PLoS Genetics **8**(3): e1002548.

Liu, B. and J.-S. Hong (2003). "Role of Microglia in Inflammation-Mediated Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Strategies for Therapeutic Intervention." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **304**(1): 1-7.

Liu, S., I. Ninan, I. Antonova, F. Battaglia, F. Trinchese, A. Narasanna, N. Kolodilov, W. Dauer, R. D. Hawkins and O. Arancio (2004). " α -Synuclein produces a long-lasting increase in neurotransmitter release." The EMBO Journal **23**(22): 4506-4516.

Liu, Z., Y. Yu, X. Li, C. A. Ross and W. W. Smith (2011). "Curcumin protects against A53T α -synuclein-induced toxicity in a PC12 inducible cell model for Parkinsonism." Pharmacological Research **63**(5): 439-444.

Lorenzen, N., L. Lemminger, J. N. Pedersen, S. B. Nielsen and D. E. Otzen (2014). "The N-terminus of α -synuclein is essential for both monomeric and oligomeric interactions with membranes." FEBS Letters **588**(3): 497-502.

Lu, Z. and S. Xu (2006). "ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis." IUBMB Life **58**(11): 621-631.

Lull, M. E. and M. L. Block (2010). "Microglial Activation & Chronic Neurodegeneration." Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics **7**(4): 354-365.

Lv, C., L. Zhang, Q. Wang, W. Liu, C. Wang, X. Jing and Y. Liu (2006). "Determination of piceid in rat plasma and tissues by high-performance liquid chromatographic method with UV detection." Biomedical Chromatography **20**(11): 1260-1266.

Madamanchi, N. R., A. Vendrov and M. S. Runge (2005). "Oxidative Stress and Vascular Disease." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology **25**(1): 29-38.

Maher, P., R. Dargusch, L. Bodai, P. E. Gerard, J. M. Purcell and J. L. Marsh (2011). "ERK activation by the polyphenols fisetin and resveratrol provides neuroprotection in multiple models of Huntington's disease." Human Molecular Genetics **20**(2): 261-270.

Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy and L. Jiménez (2004). "Polyphenols: food sources and bioavailability." The American Journal of Clinical Nutrition **79**(5): 727-747.

Manning-Bog, A. B., A. L. McCormack, J. Li, V. N. Uversky, A. L. Fink and D. A. Di Monte (2002). "The Herbicide Paraquat Causes Up-regulation and Aggregation of α -Synuclein in Mice: PARAQUAT AND α -SYNUCLEIN." Journal of Biological Chemistry **277**(3): 1641-1644.

Mantena, S. K., M. S. Baliga and S. K. Katiyar (2006). "Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit metastasis of highly metastatic breast carcinoma cells." Carcinogenesis **27**(8): 1682-1691.

Marambaud, P., H. Zhao and P. Davies (2005). "Resveratrol Promotes Clearance of Alzheimer's Disease Amyloid- β Peptides." Journal of Biological Chemistry **280**(45): 37377-37382.

Maroteaux, L., J. Campanelli and R. Scheller (1988). "Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal." The Journal of Neuroscience **8**(8): 2804-2815.

Masuda, M., N. Suzuki, S. Taniguchi, T. Oikawa, T. Nonaka, T. Iwatsubo, S.-i. Hisanaga, M. Goedert and M. Hasegawa (2006). "Small Molecule Inhibitors of α -Synuclein Filament Assembly†." Biochemistry **45**(19): 6085-6094.

McGeer, E. G., A. Klegeris and P. L. McGeer (2005). "Inflammation, the complement system and the diseases of aging." Neurobiology of Aging **26**(1, Supplement): 94-97.

McGeer, P. L. and E. G. McGeer (2008). "Glial reactions in Parkinson's disease." Movement Disorders **23**(4): 474-483.

McGuire, S. O., Z. D. Ling, J. W. Lipton, C. E. Sortwell, T. J. Collier and P. M. Carvey (2001). "Tumor necrosis factor α is toxic to embryonic mesencephalic dopamine neurons." Experimental Neurology **169**(2): 219-230.

Mehta, R. G., R. R. Mehta, G. Lazzaro, A. Constantinou, R. M. Moriarty, R. Penmasta and L. Guo (1997). "Prevention of Preneoplastic Mammary Lesion Development by a Novel Vitamin D Analogue, 1α -Hydroxyvitamin D5." Journal of the National Cancer Institute **89**(3): 212-218.

Meng, X., L. A. Munishkina, A. L. Fink and V. N. Uversky (2010). "Effects of Various Flavonoids on the α -Synuclein Fibrillation Process." Parkinson's Disease **2010**: 650794.

Mishima, S., K. Matsumoto, Y. Futamura, Y. Araki, T. Ito, T. Tanaka, M. Inuma, Y. Nozawa and Y. Akao (2003). "Antitumor effect of stilbenoids from *Vateria indica* against allografted sarcoma S-180 in animal model." Journal of Experimental Therapeutics and Oncology **3**(5): 283-288.

Moco, S., L.-H. Tseng, M. Spraul, Z. Chen and J. Vervoort (2006). "Building-Up a Comprehensive Database of Flavonoids Based on Nuclear Magnetic Resonance Data." Chromatographia **64**(9-10): 503-508.

Moss, R., Q. Mao, D. Taylor and C. Saucier (2013). "Investigation of monomeric and oligomeric wine stilbenoids in red wines by ultra-high-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry." Rapid Communications in Mass Spectrometry **27**(16): 1815-1827.

Mouradov, A. and G. Spangenberg (2014). "Flavonoids: a metabolic network mediating plants adaptation to their real estate." Frontiers in Plant Science **5**: 620.

Munishkina, L. A., C. Phelan, V. N. Uversky and A. L. Fink (2003). "Conformational Behavior and Aggregation of α -Synuclein in Organic Solvents: Modeling the Effects of Membranes†." Biochemistry **42**(9): 2720-2730.

Murphy, M. P. and H. LeVine (2010). "Alzheimer's Disease and the β -Amyloid Peptide." Journal of Alzheimer's disease : JAD **19**(1): 311.

Nakamura, K., V. M. Nemani, F. Azarbal, G. Skibinski, J. M. Levy, K. Egami, L. Munishkina, J. Zhang, B. Gardner, J. Wakabayashi, H. Sesaki, Y. Cheng, S. Finkbeiner, R. L. Nussbaum, E. Masliah and R. H. Edwards (2011). "Direct Membrane Association Drives Mitochondrial Fission by the Parkinson Disease-associated Protein α -Synuclein." The Journal of Biological Chemistry **286**(23): 20710-20726.

Nakamura, K., V. M. Nemani, E. K. Wallender, K. Kaehlcke, M. Ott and R. H. Edwards (2008). "Optical Reporters for the Conformation of α -Synuclein Reveal a Specific Interaction with Mitochondria." The Journal of Neuroscience **28**(47): 12305-12317.

Narendra, D., A. Tanaka, D.-F. Suen and R. J. Youle (2008). "Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy." The Journal of Cell Biology **183**(5): 795-803.

Narkiewicz, J., G. Giachin and G. Legname (2014). "In vitro aggregation assays for the characterization of α -synuclein prion-like properties." Prion **8**(1): 19-32.

Nassra, M., S. Krisa, Y. Papastamoulis, G. D. Kapche, J. Bisson, C. André, J.-P. Konsman, J.-M. Schmitter, J.-M. Mérillon and P. Waffo-Tégou (2013). "Inhibitory Activity of Plant Stilbenoids against Nitric Oxide Production by Lipopolysaccharide-Activated Microglia." Planta Med **79**(11): 966-970.

Nielsen, S. B., F. Macchi, S. Raccosta, A. E. Langkilde, L. Giehm, A. Kyrsting, A. S. P. Svane, M. Manno, G. Christiansen, N. C. Nielsen, L. Oddershede, B. Vestergaard and D. E. Otzen (2013). "Wildtype and A30P Mutant Alpha-Synuclein Form Different Fibril Structures." PLoS ONE **8**(7): e67713.

Nunomura, A., P. I. Moreira, H. G. Lee, X. Zhu, R. J. Castellani, M. A. Smith and G. Perry (2007). "Neuronal Death and Survival Under Oxidative Stress in Alzheimer and Parkinson Diseases." CNS & Neurological Disorders - Drug Targets (Formerly Current Drug Targets **6**(6): 411-423.

Ohyama, M., T. Tanaka, T. Ito, M. Iinuma, K. F. Bastow and K.-H. Lee (1999). "Antitumor agents 200.1 cytotoxicity of naturally occurring resveratrol oligomers and their acetate derivatives." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **9**(20): 3057-3060.

Olanow, C. W. (2008). "Levodopa/dopamine replacement strategies in Parkinson's disease—Future directions." Movement Disorders **23**(S3): S613-S622.

Ono, K. and M. Yamada (2006). "Antioxidant compounds have potent anti-fibrillogenic and fibril-destabilizing effects for α -synuclein fibrils in vitro." Journal of Neurochemistry **97**(1): 105-115.

Papastamoulis, Y., J. Bisson, H. Temsamani, T. Richard, A. Marchal, J.-M. Mérillon and P. Waffo-Tégou (2015). "New E-miyabenol isomer isolated from grapevine cane using centrifugal partition chromatography guided by mass spectrometry." Tetrahedron **71**(20): 3138-3142.

Pawlus, A. D., E. Cantos-Villar, T. Richard, J. Bisson, P. Poupard, Y. Papastamoulis, J.-P. Monti, P.-L. Teissedre, P. Waffo-Tégou and J.-M. Mérillon (2013). "Chemical dereplication of wine stilbenoids using high performance liquid chromatography–nuclear magnetic resonance spectroscopy." Journal of Chromatography A **1289**: 19-26.

Pawlus, A. D., R. Sahli, J. Bisson, C. Rivière, J.-C. Delaunay, T. Richard, E. Gomès, L. Bordenave, P. Waffo-Tégou and J.-M. Mérillon (2013). "Stilbenoid Profiles of Canes from Vitis and Muscadinia Species." Journal of Agricultural and Food Chemistry **61**(3): 501-511.

Pawlus, A. D., P. Waffo-Tégou, J. Shaver and J. M. Mérillon (2012). "Stilbenoid chemistry from wine and the genus vitis, a review." Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin **46**(2): 57-111.

Peng, J., M. L. Oo and J. K. Andersen (2010). "Synergistic effects of environmental risk factors and gene mutations in Parkinson's disease accelerate age-related neurodegeneration." Journal of neurochemistry **115**(6): 1363-1373.

Pezet, R., K. Gindro, O. Viret and J. L. Spring (2004). "Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew." Physiological and Molecular Plant Pathology **65**(6): 297-303.

Piver, B., F. Berthou, Y. Dreano and D. Lucas (2003). "Differential inhibition of human cytochrome P450 enzymes by ϵ -viniferin, the dimer of resveratrol: Comparison with resveratrol and polyphenols from alcoholized beverages." Life Sciences **73**(9): 1199-1213.

Poudel, P. R., H. Tamura, I. Kataoka and R. Mochioka (2008). "Phenolic compounds and antioxidant activities of skins and seeds of five wild grapes and two hybrids native to Japan." Journal of Food Composition and Analysis **21**(8): 622-625.

Pountney, D. L., R. Lowe, M. Quilty, J. C. Vickers, N. H. Voelcker and W. P. Gai (2004). "Annular α -synuclein species from purified multiple system atrophy inclusions." Journal of Neurochemistry **90**(2): 502-512.

Purisai, M. G., A. L. McCormack, S. Cumine, J. Li, M. Z. Isla and D. A. Di Monte (2007). "Microglial activation as a priming event leading to paraquat-induced dopaminergic cell degeneration." Neurobiology of disease **25**(2): 392-400.

Qian, L., X. Gao, Z. Pei, X. Wu, M. Block, B. Wilson, J.-S. Hong and P. M. Flood (2007). "NADPH oxidase inhibitor DPI is neuroprotective at femtomolar concentrations through inhibition of microglia over-activation." Parkinsonism & Related Disorders **13**, **Supplement 3**: S316-S320.

Rappold, P. M., M. Cui, A. S. Chesser, J. Tibbett, J. C. Grima, L. Duan, N. Sen, J. A. Javitch and K. Tieu (2011). "Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3." Proceedings of the National Academy of Sciences **108**(51): 20766-20771.

Reeve, A., E. Simcox and D. Turnbull (2014). "Ageing and Parkinson's disease: Why is advancing age the biggest risk factor?" Ageing Research Reviews **14**: 19-30.

Richard, T., Y. Papastamoulis, P. Waffo-Teguo and J.-P. Monti (2013). "3D NMR structure of a complex between the amyloid beta peptide (1–40) and the polyphenol ϵ -viniferin glucoside: Implications in Alzheimer's disease." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **1830**(11): 5068-5074.

Richard, T., P. Poupard, M. Nassra, Y. Papastamoulis, M.-L. Iglésias, S. Krisa, P. Waffo-Teguo, J.-M. Mérillon and J.-P. Monti (2011). "Protective effect of ϵ -viniferin on β -amyloid peptide aggregation investigated by electrospray ionization mass spectrometry." Bioorganic & Medicinal Chemistry **19**(10): 3152-3155.

Richard, T., H. Temsamani, E. Cantos-Villar and J.-P. Monti (2013). Chapter Two - Application of LC–MS and LC–NMR Techniques for Secondary Metabolite Identification. Advances in Botanical Research. R. Dominique, Academic Press. **Volume 67**: 67-98.

Rideout, H. and L. Stefanis (2014). "The Neurobiology of LRRK2 and its Role in the Pathogenesis of Parkinson's Disease." Neurochemical Research **39**(3): 576-592.

Rivière, C., Y. Papastamoulis, P.-Y. Fortin, N. Delchier, S. Andriamanarivo, P. Waffo-Teguo, G. D. W. F. Kapche, H. Amira-Guebalia, J.-C. Delaunay, J.-M. Mérillon, T. Richard and J.-P. Monti (2010). "New stilbene dimers against amyloid fibril formation." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **20**(11): 3441-3443.

Rivière, C., T. Richard, X. Vitrac, J.-M. Mérillon, J. Valls and J.-P. Monti (2008). "New polyphenols active on β -amyloid aggregation." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **18**(2): 828-831.

Rochet, J.-C. and F. Liu (2009). Inhibition of α -Synuclein Aggregation by Antioxidants and Chaperones in Parkinson's Disease. Protein Folding and Misfolding: Neurodegenerative Diseases. J. Ovádi and F. Orosz, Springer Netherlands. **7**: 175-206.

Rodriguez-Pallares, J., J. A. Parga, A. Muñoz, P. Rey, M. J. Guerra and J. L. Labandeira-Garcia (2007). "Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: the role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons." Journal of Neurochemistry **103**(1): 145-156.

Rodríguez-Rivera, M. P., E. Lugo-Cervantes, P. Winterhalter and G. Jerz (2014). "Metabolite profiling of polyphenols in peels of Citrus limetta Risso by combination of preparative high-speed countercurrent chromatography and LC-ESI-MS/MS." Food Chemistry **158**: 139-152.

Rouser, G., S. Fleischer and A. Yamamoto (1970). "Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots." Lipids **5**(5): 494-496.

Roy, S. and L. Wolman (1969). "Ultrastructural observations in Parkinsonism." The Journal of Pathology **99**(1): 39-44.

Russo, I., L. Bubacco and E. Greggio (2014). "LRRK2 and neuroinflammation: partners in crime in Parkinson's disease?" Journal of Neuroinflammation **11**(1): 52.

Saijo, K., A. Crotti and C. K. Glass (2013). "Regulation of microglia activation and deactivation by nuclear receptors." Glia **61**(1): 104-111.

Saleem, M., H. J. Kim, M. S. Ali and Y. S. Lee (2005). "An update on bioactive plant lignans." Natural Product Reports **22**(6): 696-716.

Sandhu, A. K. and L. Gu (2010). "Antioxidant Capacity, Phenolic Content, and Profiling of Phenolic Compounds in the Seeds, Skin, and Pulp of Vitis rotundifolia (Muscadine Grapes) As Determined by HPLC-DAD-ESI-MSn." Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**(8): 4681-4692.

Santangelo, C., R. Vari, B. Scazzocchio, R. Di Benedetto, C. Filesi and R. Masella (2007). "Polyphenols, intracellular signalling and inflammation." Annali dell'Istituto Superiore di Sanita **43**(4): 394-405.

Sato, M., N. Maulik and D. K. Das (2002). "Cardioprotection with Alcohol." Annals of the New York Academy of Sciences **957**(1): 122-135.

- Sato, M., N. Ramarathnam, Y. Suzuki, T. Ohkubo, M. Takeuchi and H. Ochi (1996). "Varietal Differences in the Phenolic Content and Superoxide Radical Scavenging Potential of Wines from Different Sources." Journal of Agricultural and Food Chemistry **44**(1): 37-41.
- Sebastià, N., A. Montoro, J. Mañes and J. M. Soriano (2012). "A preliminary study of presence of resveratrol in skins and pulps of European and Japanese plum cultivars." Journal of the Science of Food and Agriculture **92**(15): 3091-3094.
- Sian-Hülsmann, J., S. Mandel, M. B. H. Youdim and P. Riederer (2011). "The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease." Journal of Neurochemistry **118**(6): 939-957.
- Singleton, A. B., M. Farrer, J. Johnson, A. Singleton, S. Hague, J. Kachergus, M. Hulihan, T. Peuralinna, A. Dutra, R. Nussbaum, S. Lincoln, A. Crawley, M. Hanson, D. Maraganore, C. Adler, M. R. Cookson, M. Muenter, M. Baptista, D. Miller, J. Blancato, J. Hardy and K. Gwinn-Hardy (2003). "α-Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease." Science **302**(5646): 841.
- Smith, W. W., H. Jiang, Z. Pei, Y. Tanaka, H. Morita, A. Sawa, V. L. Dawson, T. M. Dawson and C. A. Ross (2005). "Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant alpha-synuclein-induced toxicity." Human Molecular Genetics **14**(24): 3801-3811.
- Smith, W. W., Z. Liu, Y. Liang, N. Masuda, D. A. Swing, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, J. C. Troncoso, M. Pletnikov, T. M. Dawson, L. J. Martin, T. H. Moran, M. K. Lee, D. R. Borchelt and C. A. Ross (2010). "Synphilin-1 attenuates neuronal degeneration in the A53T α-synuclein transgenic mouse model." Human Molecular Genetics **19**(11): 2087-2098.
- Solans, A., A. Zambrano, M. Rodríguez and A. Barrientos (2006). "Cytotoxicity of a mutant huntingtin fragment in yeast involves early alterations in mitochondrial OXPHOS complexes II and III." Human Molecular Genetics **15**(20): 3063-3081.
- Spillantini, M. G., R. A. Crowther, R. Jakes, M. Hasegawa and M. Goedert (1998). "α-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(11): 6469-6473.
- Spira, P. J., D. M. Sharpe, G. Halliday, J. Cavanagh and G. A. Nicholson (2001). "Clinical and pathological features of a Parkinsonian syndrome in a family with an Ala53Thr α-synuclein mutation." Annals of Neurology **49**(3): 313-319.
- Stervbo, U., O. Vang and C. Bonnesen (2007). "A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine." Food Chemistry **101**(2): 449-457.
- Strand, A. D., Z. C. Baquet, A. K. Aragaki, P. Holmans, L. Yang, C. Cleren, M. F. Beal, L. Jones, C. Kooperberg, J. M. Olson and K. R. Jones (2007). "Expression Profiling of Huntington's Disease Models Suggests That Brain-Derived Neurotrophic Factor Depletion Plays a Major Role in Striatal Degeneration." The Journal of Neuroscience **27**(43): 11758-11768.

Stsiapura, V. I., A. A. Maskevich, V. A. Kuzmitsky, V. N. Uversky, I. M. Kuznetsova and K. K. Turoverov (2008). "Thioflavin T as a Molecular Rotor: Fluorescent Properties of Thioflavin T in Solvents with Different Viscosity." The Journal of Physical Chemistry B **112**(49): 15893-15902.

Sugama, S., L. Yang, B. P. Cho, L. A. DeGiorgio, S. Lorenzl, D. S. Albers, M. F. Beal, B. T. Volpe and T. H. Joh (2003). "Age-related microglial activation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurodegeneration in C57BL/6 mice." Brain Research **964**(2): 288-294.

Tanner, C. M., F. Kamel, G. W. Ross, J. A. Hoppin, S. M. Goldman, M. Korell, C. Marras, G. S. Bhudhikanok, M. Kasten, A. R. Chade, K. Comyns, M. B. Richards, C. Meng, B. Priestley, H. H. Fernandez, F. Cambi, D. M. Umbach, A. Blair, D. P. Sandler and J. W. Langston (2011). "Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease." Environmental Health Perspectives **119**(6): 866-872.

Teixeira, N., J. Azevedo, N. Mateus and V. de Freitas (2016). "Proanthocyanidin screening by LC-ESI-MS of Portuguese red wines made with teinturier grapes." Food Chemistry **190**: 300-307.

Tolomeo, M., S. Grimaudo, A. D. Cristina, M. Roberti, D. Pizzirani, M. Meli, L. Dusonchet, N. Gebbia, V. Abbadessa, L. Crosta, R. Barucchello, G. Grisolia, F. Invidiata and D. Simoni (2005). "Pterostilbene and 3'-hydroxypterostilbene are effective apoptosis-inducing agents in MDR and BCR-ABL-expressing leukemia cells." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **37**(8): 1709-1726.

Valente, E. M., S. Salvi, T. Ialongo, R. Marongiu, A. E. Elia, V. Caputo, L. Romito, A. Albanese, B. Dallapiccola and A. R. Bentivoglio (2004). "PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism." Annals of Neurology **56**(3): 336-341.

van Rooijen, B. D., M. M. A. E. Claessens and V. Subramaniam (2009). "Lipid bilayer disruption by oligomeric α -synuclein depends on bilayer charge and accessibility of the hydrophobic core." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1788**(6): 1271-1278.

Vedam-Mai, V., E. Y. van Battum, W. Kamphuis, M. G. P. Feenstra, D. Denys, B. A. Reynolds, M. S. Okun and E. M. Hol (2012). "Deep brain stimulation and the role of astrocytes." Mol Psychiatry **17**(2): 124-131.

Visanji, N. P., P. L. Brooks, L.-N. Hazrati and A. E. Lang (2013). "The prion hypothesis in Parkinson's disease: Braak to the future." Acta Neuropathologica Communications **1**: 2-2.

Vitrac, X., A. Bornet, R. Vanderlinde, J. Valls, T. Richard, J.-C. Delaunay, J.-M. Mérillon and P.-L. Teissédre (2005). "Determination of Stilbenes (δ -viniferin, trans-astringin, trans-piceid, cis- and trans-resveratrol, ϵ -viniferin) in Brazilian Wines." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(14): 5664-5669.

Vitrac, X., A. Desmoulière, B. Brouillaud, S. Krisa, G. Deffieux, N. Barthe, J. Rosenbaum and J.-M. Mérillon (2003). "Distribution of [¹⁴C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration." Life Sciences **72**(20): 2219-2233.

Volles, M. J. and P. T. Lansbury (2002). "Vesicle Permeabilization by Protofibrillar α -Synuclein Is Sensitive to Parkinson's Disease-Linked Mutations and Occurs by a Pore-like Mechanism[†]." Biochemistry **41**(14): 4595-4602.

Waffo-Téguo, P., M. E. Hawthorne, M. Cuendet, J. M. Mérillon, A. D. Kinghorn, J. M. Pezzuto and R. G. Mehta (2001). "Potential cancer-chemopreventive activities of wine stilbenoids and flavans extracted from grape (*Vitis vinifera*) cell cultures." Nutrition and Cancer **40**(2): 173-179.

Waffo Tegu, P., B. Fauconneau, G. Deffieux, F. Huguet, J. Vercauteren and J.-M. Mérillon (1998). "Isolation, Identification, and Antioxidant Activity of Three Stilbene Glucosides Newly Extracted from *Vitis vinifera* Cell Cultures." Journal of Natural Products **61**(5): 655-657.

Wang, A., S. Costello, M. Cockburn, X. Zhang, J. Bronstein and B. Ritz (2011). "Parkinson's disease risk from ambient exposure to pesticides." European journal of epidemiology **26**(7): 547-555.

Warner, T. T. and A. H. V. Schapira (2003). "Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease." Annals of Neurology **53**(S3): S16-S25.

Waterhouse, A. L. (2002). "Wine Phenolics." Annals of the New York Academy of Sciences **957**(1): 21-36.

Weisskopf, M. G., J. Weuve, H. Nie, M.-H. Saint-Hilaire, L. Sudarsky, D. K. Simon, B. Hersh, J. Schwartz, R. O. Wright and H. Hu (2010). "Association of Cumulative Lead Exposure with Parkinson's Disease." Environmental Health Perspectives **118**(11): 1609-1613.

Wieder, T., A. Prokop, B. Bagci, F. Essmann, D. Bernicke, K. Schulze-Osthoff, B. Dörken, H. G. Schmalz, P. T. Daniel and G. Henze (2001). "Piceatannol, a hydroxylated analog of the chemopreventive agent resveratrol, is a potent inducer of apoptosis in the lymphoma cell line BJAB and in primary, leukemic lymphoblasts." Leukemia **15**(11): 1735-1742.

Winner, B., R. Jappelli, S. K. Maji, P. A. Desplats, L. Boyer, S. Aigner, C. Hetzer, T. Loher, M. Vilar, S. Campioni, C. Tzitzilonis, A. Soragni, S. Jessberger, H. Mira, A. Consiglio, E. Pham, E. Masliah, F. H. Gage and R. Riek (2011). "In vivo demonstration that α -synuclein oligomers are toxic." Proceedings of the National Academy of Sciences **108**(10): 4194-4199.

Wu, X.-F., M. L. Block, W. Zhang, L. Qin, B. Wilson, W.-Q. Zhang, B. Veronesi and J.-S. Hong (2005). "The Role of Microglia in Paraquat-Induced Dopaminergic Neurotoxicity." Antioxidants & Redox Signaling **7**(5-6): 654-661.

Xu, S. and P. Chan (2015). "Interaction between Neuromelanin and Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease." Biomolecules **5**(2): 1122.

- Yamin, G., C. B. Glaser, V. N. Uversky and A. L. Fink (2003). "Certain Metals Trigger Fibrillation of Methionine-oxidized α -Synuclein." Journal of Biological Chemistry **278**(30): 27630-27635.
- Yao, C.-S., M. Lin and Q.-Y. Yang (2012). "A new resveratrol trimer derivative from Gnetum brunonianum." Journal of Asian Natural Products Research **14**(9): 918-922.
- Zamora-Ros, R., C. Andres-Lacueva, R. M. Lamuela-Raventós, T. Berenguer, P. Jakszyn, C. Martínez, M. J. Sánchez, C. Navarro, M. D. Chirlaque, M.-J. Tormo, J. R. Quirós, P. Amiano, M. Dorronsoro, N. Larrañaga, A. Barricarte, E. Ardanaz and C. A. González (2008). "Concentrations of resveratrol and derivatives in foods and estimation of dietary intake in a Spanish population: European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Spain cohort." British Journal of Nutrition **100**(01): 188-196.
- Zarranz, J. J., J. Alegre, J. C. Gómez-Esteban, E. Lezcano, R. Ros, I. Ampuero, L. Vidal, J. Hoenicka, O. Rodriguez, B. Atarés, V. Llorens, E. G. Tortosa, T. del Ser, D. G. Muñoz and J. G. de Yebenes (2004). "The new mutation, E46K, of α -synuclein causes parkinson and Lewy body dementia." Annals of Neurology **55**(2): 164-173.
- Zecca, L., M. B. H. Youdim, P. Riederer, J. R. Connor and R. R. Crichton (2004). "Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders." Nat Rev Neurosci **5**(11): 863-873.
- Zhang, F., J. Liu and J.-S. Shi (2010). "Anti-inflammatory activities of resveratrol in the brain: Role of resveratrol in microglial activation." European Journal of Pharmacology **636**(1–3): 1-7.
- Zhang, W., T. Wang, Z. Pei, D. S. Miller, X. Wu, M. L. Block, B. Wilson, W. Zhang, Y. Zhou, J.-S. Hong and J. Zhang (2005). "Aggregated α -synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease." The FASEB Journal **19**(6): 533-542.
- Zhu, M., S. Rajamani, J. Kaylor, S. Han, F. Zhou and A. L. Fink (2004). "The Flavonoid Baicalein Inhibits Fibrillation of α -Synuclein and Disaggregates Existing Fibrils." Journal of Biological Chemistry **279**(26): 26846-26857.

Annexes

Liste des publications

Temsamani, H., S. Krisa, M. Decosas, O. Lambert, J-M. Merillon and T. Richard. "Resveratrol derivatives: a pool of inhibitors against α -synuclein aggregation and cytotoxicity" – en cours de publication.

Temsamani, H., S. Krisa, J-M. Merillon and T. Richard (2015). "Promising neuroprotective effects of oligostilbenes". *Nutrition and Aging* 3(1): 49-54.

Papastamoulis, Y., J. Bisson, **H. Temsamani**, T. Richard, A. Marchal, J.-M. Mériillon and P. Waffo-Téguo (2015). "New E-miyabenol isomer isolated from grapevine cane using centrifugal partition chromatography guided by mass spectrometry." *Tetrahedron* 71(20): 3138-3142.

Temsamani, H., G. Hilbert, L. Bordenave, E. Pedrot, N. Chaher, S. Cluzet, J.-C. Delaunay, N. Ollat, S. Delrot, J.-M. Mériillon, E. Gomès and T. Richard (2015). "Flavonol profiles in berries of wild *Vitis* accessions using liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectrometry." *Food Chemistry* 169: 49-58.

Richard, T., **H. Temsamani**, J.-C. Delaunay, S. Krisa and J.-M. Mériillon (2014). "Stilbènes: de la chimie à la neuroprotection." *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 49(4): 173-180

Chaher, N., K. Arraki, E. Dillinseger, **H. Temsamani**, S. Bernillon, E. Pedrot, J.-C. Delaunay, J.-M. Mériillon, J.-P. Monti, J.-C. Izard, D. Atmani and T. Richard (2014). "Bioactive stilbenes from *Vitis vinifera* grapevine shoots extracts." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94(5): 951-954.

Richard, T., **H. Temsamani**, E. Cantos-Villar and J.-P. Monti (2013). Chapter Two - Application of LC–MS and LC–NMR Techniques for Secondary Metabolite Identification. *Advances in Botanical Research*. R. Dominique, Academic Press. Volume 67: 67-98.

Jobin, M.-L., P. Bonnafous, **H. Temsamani**, F. Dole, A. Grélard, E. J. Dufourc and I. D. Alves (2013). "The enhanced membrane interaction and perturbation of a cell penetrating peptide in the presence of anionic lipids: Toward an understanding of its selectivity for cancer cells." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1828(6): 1457-1470.

**Provided for non-commercial research and educational use only.
Not for reproduction, distribution or commercial use.**

This chapter was originally published in the Book *Advances in Botanical Research* Vol. 67 published by Elsevier, and the attached copy is provided by Elsevier for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for non-commercial research and educational use including without limitation use in instruction at your institution, sending it to specific colleagues who know you, and providing a copy to your institution's administrator.



All other uses, reproduction and distribution, including without limitation commercial reprints, selling or licensing copies or access, or posting on open internet sites, your personal or institution's website or repository, are prohibited. For exceptions, permission may be sought for such use through Elsevier's permissions site at:

<http://www.elsevier.com/locate/permissionusematerial>

From: Tristan Richard, Hamza Temsamani, Emma Cantos-Villar, Jean-Pierre Monti,
Application of LC–MS and LC–NMR Techniques for Secondary Metabolite
Identification. In Dominique Rolin, editor: *Advances in Botanical Research* Vol. 67,
Burlington: Academic Press, 2013, pp. 67-98.

ISBN: 978-0-12-397922-3

© Copyright 2013 Elsevier Ltd.

Academic Press



Application of LC–MS and LC–NMR Techniques for Secondary Metabolite Identification

Tristan Richard^{*,1}, Hamza Temsamani^{*}, Emma Cantos-Villar[†], Jean-Pierre Monti^{*}

^{*}Université de Bordeaux, ISVV, Groupe d'Etude des Substances Végétales à Activité Biologique, EA 3675, Villenave d'Ornon, France

[†]Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA), Rancho de la Merced, Junta de Andalucía, Jerez de la Frontera, Cadiz, Spain

¹Corresponding author: e-mail address: tristan.richard@u-bordeaux2.fr

Contents

1. Introduction	68
2. Principal Secondary Metabolites in Plants	69
2.1 Terpenoids	69
2.2 Alkaloids	71
2.3 Phenolic compounds	73
3. Hyphenated Chromatographic Techniques in Metabolite Identification	75
4. LC–NMR Techniques	79
4.1 LC–NMR spectrometry in natural product identification	79
4.2 Principal modes of acquisition for LC–NMR	79
5. Combination of LC–MS and LC–NMR in Metabolite Profiling	91
6. Conclusion	94
References	95

Abstract

An overview of advancements and applications of liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance (LC–NMR) is given and discussed for secondary metabolites in the plant kingdom: terpenoids, alkaloids and phenolic compounds. The different LC–NMR operating modes are presented in order to structure compound elucidation. On-flow and stop-flow modes are described, together with technical improvements such as LC–SPE–NMR and capLC–NMR. Synergetic combination of hyphenated techniques coupled to mass spectrometry and NMR is illustrated and discussed with an example.



1. INTRODUCTION

In the last two decades, rapid and efficient characterization of secondary metabolites has become a great challenge for drug research and natural product investigations. A large number of known natural products have been identified by classical techniques. Compounds were generally isolated from plant extracts by semi-preparative liquid chromatography and identified using classical spectrometric techniques such as ultraviolet–visible (UV–Vis), infrared, mass spectrometry (MS) or nuclear magnetic resonance (NMR). Nevertheless, this process is time-consuming. In order to eliminate the isolation and purification of compounds from the matrix, hyphenated analytical techniques such as high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry (LC–MS) or NMR (LC–NMR) have been developed for natural product investigations.

LC–MS is widely used in phytochemical studies for compound identification in complex plant matrices as it presents both high sensitivity and efficiency (Garcia-Beneytez, Cabello, & Revilla, 2003; Guerrero et al., 2009). LC–MS can also be used for compounds characterization by using multiple stage MS experiments (Hossain, Rai, Brunton, Martin-Diana, & Barry-Ryan, 2010; Tsimogiannis, Samiotaki, Panayotou, & Oreopoulou, 2007). Nevertheless, LC–MS alone cannot successfully identify all unknown complex compounds in plant extracts. For example, MS is unable to distinguish between geometrical or optical stereoisomers. In those cases, NMR allows unambiguous structure determination for the individually isolated compounds.

NMR is widely used for studying secondary metabolites from natural plant extracts. It is the most powerful technique for structural identification of unknown complex compounds. Nevertheless, classical NMR studies involve isolation and purification of compounds before NMR spectra acquisition. To reduce these time-consuming steps, physical coupling between liquid chromatography and NMR has been developed over the last 20 years. In practical, LC–NMR routine applications have been successfully applied only in the last decade (Emerson, Kurt, & Jean-Luc, 2007; Exarchou et al., 2005; Silva Elipe, 2003; Sturm & Seger, 2012; Wolfender, Ndjoko, & Hostettmann, 2001).

The present chapter gives an overview of the LC–NMR techniques for identifying natural compounds from the three major classes of secondary metabolites: terpenoids, alkaloids and phenolic compounds. The different LC–NMR techniques are presented from the more basic one, on-flow

NMR measurements, to more complex ones such as Liquid chromatography solid-phase extraction nuclear magnetic resonance (LC–SPE–NMR) or capLC–NMR techniques.

Currently, synergistic combination of LC–MS and LC–NMR techniques yields an efficient way for identifying natural products in complex plant matrices (Acevedo De la Cruz et al., 2012; Cogne et al., 2003). LC–MS provides a rapid preliminary screening of plant crude extract. LC–NMR analysis allows the complete structure determination of unknown natural products. To illustrate this process, an example of LC–MS and LC–NMR synergic combination is presented in order to identify secondary metabolites in plant extract.



2. PRINCIPAL SECONDARY METABOLITES IN PLANTS

Plant compounds are divided into primary and secondary metabolites. Primary metabolites, such as organic acids, amino acids, lipids and other compounds, are directly involved in growth and development or other primary functions. In contrast, secondary metabolites are not directly involved in primary functions. They have specific roles such as protection against infections and pollinator attractants. These organic compounds are widely distributed in the plant kingdom. Moreover, many of these compounds have biological effects on human health and are suggested as medicines. Thus, they are usually called as ‘plant natural products’ (Croteau, Kuchan, & Lewis, 2000; Kaufman, Brielmann, Cseke, Setzer, & Kirakosyan, 2006).

Secondary metabolites can be distinguished on the basis of their chemical structure, precursor molecules or synthetic pathway. Currently, many thousands have been successfully isolated and characterized. These phytochemical studies have induced the progress of separation techniques and spectrometric approaches such as LC–MS and LC–NMR.

Secondary metabolites can be classified into three major classes: terpenoids (55%), alkaloids (27%) and phenolic compounds (18%) (Fig. 2.1). Secondary metabolites are mainly synthesized by two pathways: mevalonic acid and shikimic acid or aromatic amino acid (Fig. 2.2).

2.1. Terpenoids

Currently, more than 30,000 terpenoids have been reported from natural products and among them are 1000 monoterpenes, 7000 sesquiterpenes and 3000 diterpenes (Bohlmann, Meyer-Gauen, & Croteau, et al., 1998).

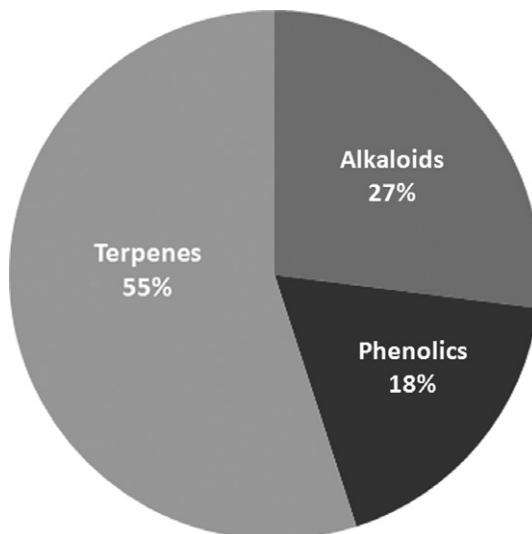


Figure 2.1 Pie chart representing the major groups of plant secondary metabolites according to [Croteau et al. \(2000\)](#). Based on their numbers and diversity, terpenes offer much potential in an array of industrial and medicinal applications.

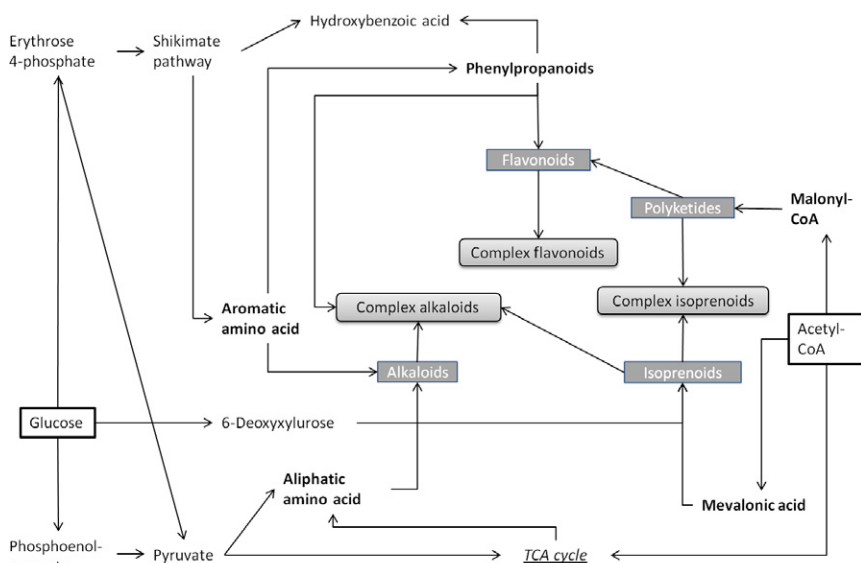


Figure 2.2 Secondary metabolites synthetic pathway.

The main biosynthetic route is known as the mevalonic acid pathway (Fig. 2.2). The second biosynthesis route to terpenes is referred to as either the 1-deoxy-D-xylulose or methylerythriol-4-phosphate pathway (Dubey, Bhalla, & Luthra, 2003; Eisenreich, Bacher, Arigoni, & Rohdich, 2004). These pathways lead to the synthesis of the isopentyl diphosphate, which is the terpenoid fundamental precursor. They are present in the entire plant kingdom, since they are involved in various vital functions such as defence against many predators, pathogens and competitors (Gershenzon & Dudareva, 2007).

Terpenes, also called isoterpenoids, are defined as a unique group of hydrocarbon-based natural products that possess a structure that may be hypothetically derived from isoprene, giving rise to structures that may be divided into isopentane (2-methylbutane) units.

This is a structurally varied class of secondary metabolites from hemiterpenes (half-terpene) to polyterpenes (Fig. 2.3). Classification of terpenoids has been established according to the number of isoprene units (Table 2.1). Monoterpenes, C₁₀ compounds, are the main constituents of both the volatile essences of flowers and of the essential oils. Examples of acyclic monoterpenes include citral, linalool and geraniol. Well-known cyclic monoterpenes include menthol, limonene and pinene (Fig. 2.3 and Table 2.1). Sesquiterpenes, C₁₅ or compounds having 3-isoprene units, exist in aliphatic bicyclic and tricyclic frameworks. A member of this series, farnesol, is a key intermediate in terpenoid biosynthesis. The diterpenes, C₂₀ compounds, are not considered as essential oils. They are composed of four isoprene units. Taxol and gibberellic acid, a plant growth regulator, are diterpenes. Triterpenes, C₃₀ or compounds having 6-isoprene units, are biosynthetically derived from squalene (Ramawat, Dass, & Mathur 2009).

Sesquiterpenes and diterpenes act as phytoalexins, antimicrobial compounds biosynthesized by plants (Stoessl, Stothers, & Ward, 1976). Some others terpenes have roles in growth and development. Plant hormones such as gibberellins, brassinosteroids and abscisic acid belong to terpenoid family. Finally, sterols and carotenoids, involved in structural function and pigmentation, are triterpenes and tetraterpenes, respectively (Ramawat et al., 2009).

2.2. Alkaloids

Alkaloids are secondary metabolites originally defined as pharmacologically active compounds, primarily composed of nitrogen (Croteau et al., 2000;

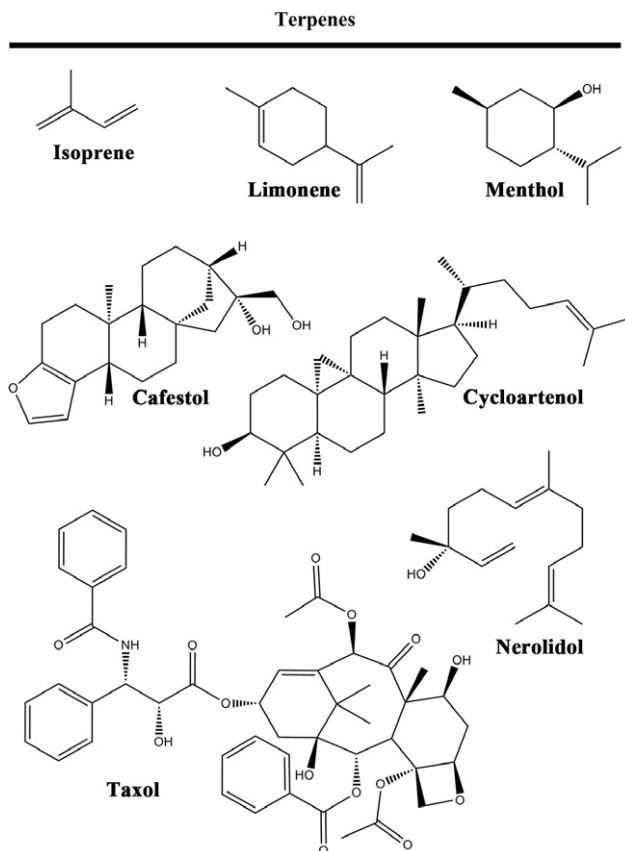


Figure 2.3 Structures of representative terpenoid compounds.

Ziegler & Facchini, 2008). They are synthesized from one of the few common amino acids: lysine, tyrosine and tryptophan. More than 12,000 alkaloids, including more than 150 families, have been identified in plants; and around 20% of the ‘species of flowering plants’ contain alkaloids. In plants, alkaloids generally exist as salts of organic acids like acetic, malic, lactic, citric, oxalic, tartaric, tannic and other acids. Some weak basic alkaloids (such as nicotine) occur freely in nature (Fig. 2.4). A few alkaloids also occur as glycosides of sugar such as glucose, rhamnose and galactose, for example, alkaloids of the solanum group (solanine), as amides (piperine) and as esters (atropine, cocaine) of organic acids (Ramawat et al., 2009).

The biological properties of various alkaloids have also led to their use as pharmaceuticals, narcotics, stimulants and poisons (Table 2.2). Since the morphine (a well-known alkaloid from *Papaver somniferum* poppy)

Table 2.1 Example of isoprenoids in plants

Class	Compounds	Source	Effects and uses
Monoterpene (C ₁₀)	Menthol	<i>Mentha piperita</i>	Antiseptic, anaesthetic
	Linalool	Lamiaceae (mentha) Lauraceae (laurel) Rutaceae (citrics)	Olfactory pollinator, attractant
	Eugenol	Clove oil	Perfumes, insect attractant
	Citral	Lemon grass oil	Lemon-like odour
Sesquiterpene (C ₁₅)	Acorone	Sweet flag oil	Insect repellent
	Artemisinin	<i>Artemisia annua</i> sweet wormwood	Anti-malaria
Diterpene (C ₂₀)	<i>p</i> -Camphorene	<i>Kaempferia rotunda</i> and <i>angustifolia</i>	Fragrances, food additive for flavouring
	Taxol	Pacific yew tree <i>Taxus brevifolia</i>	Anticancer
Triterpene (C ₃₀)	Azadirachtin	Neem seeds <i>Azadirachta indica</i>	Biological activities among pest insects
	Glycyrrhizin	Liquorice root	Antihypertensive, antiedema
	Ginsenoside rb2	Plant genus <i>Panax</i> (ginseng)	Protect memory impairment

discovery, alkaloids are widely used as drugs in modern medicine such as morphine, quinine and codeine. Thus, alkaloids at lower doses are pharmacologically useful, but are poisoning agents at high doses (Table 2.2). In fact, alkaloids can also be highly effective toxins, such as strychnine, because of their wide range of physiological effects. For that reason, this class of secondary metabolites is involved in plant chemical defences mechanisms, especially against mammals.

2.3. Phenolic compounds

Phenolic compounds are found in nearly all the plant kingdom and placed in nearly all parts of the plant. Phenolic compounds are generally synthesized via the shikimate pathway (Fig. 2.2), but the polyketide pathway can also provide some phenolics, such as orcinols and quinones.

Alkaloids

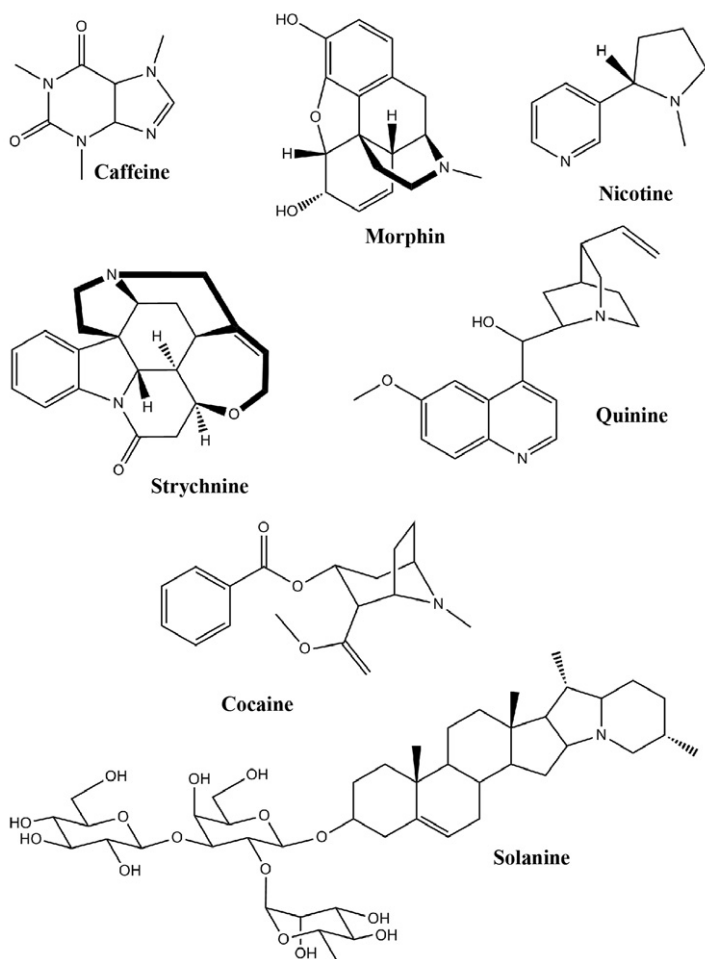


Figure 2.4 Example of alkaloids.

There is a large variability in their structure and occurrence. Phenolic compounds are aromatic metabolites that possess at least one hydroxyl group attached to an aromatic ring. More than 10,000 phenolic compounds have been described. Polyphenols can basically be divided into two groups: flavanoids and non-flavanoids (Fig. 2.5). Flavanoids have a $C_6C_3C_6$ carbon skeleton, whereas non-flavanoids show more simple structures. Flavanoids are brightly coloured compounds generally present in plants as their

Table 2.2 Example of some alkaloids in plants

Compounds	Source	Effects and uses
Morphine	<i>Papaver somniferum</i>	Analgesic
Camptothecin	<i>Camptotheca acuminata</i>	Anticancer
Atropine	<i>Hyoscyamus niger</i>	Prevention of intestinal spasms, antidote to other poisons
Vinblastine	<i>Catharanthus roseus</i>	Anticancer
Codeine	<i>Papaver somniferum</i>	Analgesic, antitusive
Caffeine	<i>Coffea arabica</i>	Stimulant, natural pesticides
Nicotine	<i>Nicotiana tabacum</i>	Stimulant, tranquillizer
Cocaine	<i>Erythroxylon coca</i>	Stimulant of the central nervous system local anesthetic

glycoside derivatives. Different classes within this group differ by additional oxygen-containing heterocyclic rings and hydroxyl groups and include numerous compounds such as flavonols, flavones, isoflavones, flavanones and anthocyanins. Anthocyanins impart red and blue pigment to flowers and fruits and can make up as much as 30% of the dry weight of some flowers. Flavonols, flavanones and anthocyanins are present as their glycoside derivatives (Ramawat et al., 2009).

Moreover, phenolic compounds are known to have a wide range of biochemical properties and health benefits (Quideau, Deffieux, Douat-Casassus, & Pouységu, 2011). Additionally, they are really important in food since they are responsible for food quality. Finally, they impact on plant growth and defence mechanisms (Table 2.3).



3. HYPHENATED CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES IN METABOLITE IDENTIFICATION

High-performance liquid chromatography coupled to mass detection (HPLC–MS) is the most frequently used technique for analyzing secondary metabolites. HPLC allows powerful and rapid separations of metabolites in a mixture, and MS immediate and highly sensitive detection. HPLC–MS has become an important tool for secondary metabolites characterization, providing mass spectrum of intact molecular and fragment ions. This technique is fast and the short exposure of the compounds to light and air limits their

Polyphenols

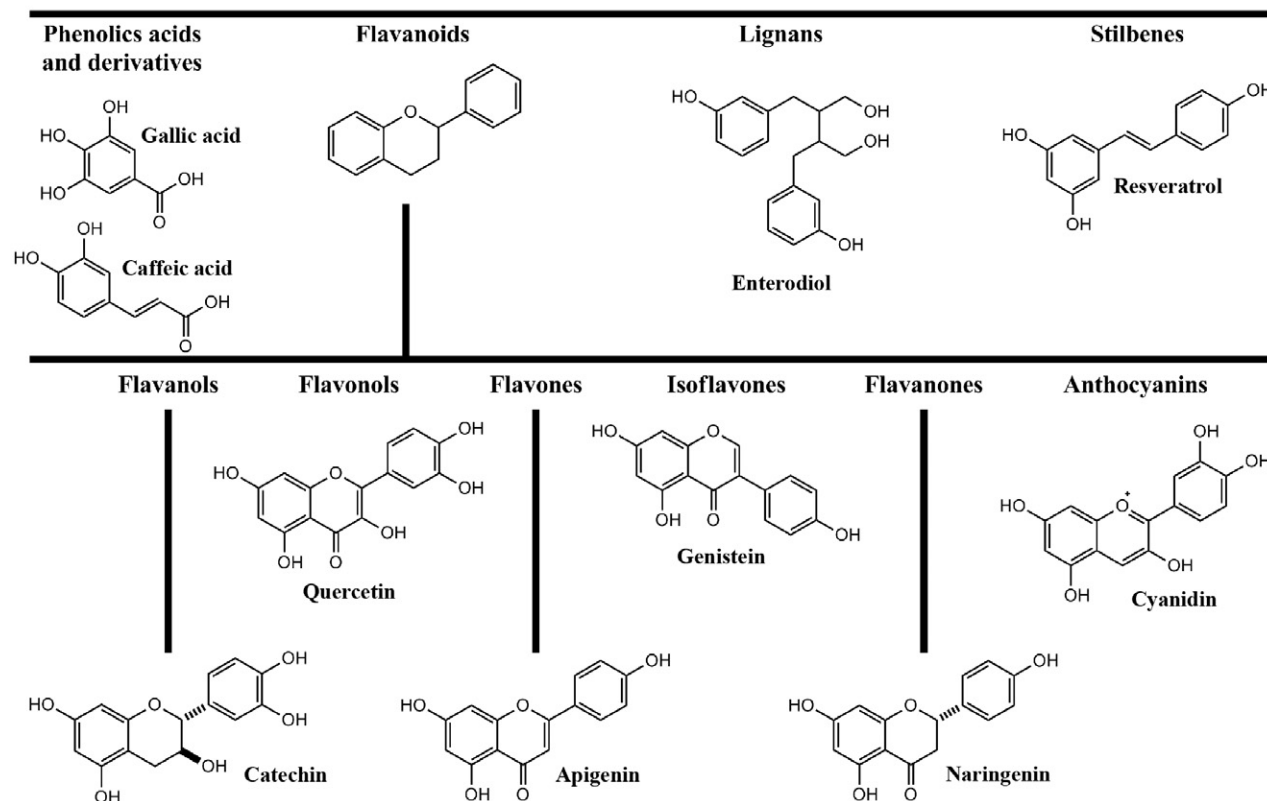


Figure 2.5 Chemical structures of polyphenols.

Table 2.3 Example of some phenolic in food

Class	Compounds	Source	Effects and uses
Anthocyanins	Cyanidin	Red fruits	Attract animals (pigments)
Flavonols	Quercetin	Tea, apple, onion	Protect from UV light damage
Flavanols	Catechin	Cocoa, tea	Antibiotic, herbicide
Flavanones	Naringenin	Grape, orange, tomato	Bitter flavour
Flavones	Apigenin	Persil, celery, green pepper	Protect from UV light damage
Isoflavones	Genistein	Soya	Antimicrobial activity
Lignanes	Enterodiol	Cereals, soybean, strawberry	Structural function
Stilbenes	Resveratrol	Grape, peanut	Defence (phytoalexin)
Coumarins	Umbeliferone	Carrot	Defence (phytoalexin)
Simple phenylpropanoid	Caffeic acid	Strawberry, grape	Precursor of many other phenolics
Benzoic acid derivatives	Salicylic acid	Lettuce, apple, plumb, artichoke	Resistance to plant pathogen

degradation. However, MS data do not give detailed and conclusive structural information, especially when isomeric compounds are studied like *cis* and *trans* conformers. In such cases, the combination of both MS and NMR spectrometries leads to unequivocal identification of the compound individual structures.

NMR spectrometry is a powerful technique allowing the complete structural elucidation and identification of natural compounds. Generally, in addition to 1D-NMR experiments (such as ^1H - and ^{13}C NMR spectra), 2D-NMR measurements are needed to identify organic compounds. Neighbourhood relationships within the proton scaffold are identified by correlated spectroscopy (COSY) and/or total correlation spectroscopy (TOCSY) measurements. Connections between proton and carbon scaffolds were investigated by ^1H – ^{13}C heteronuclear NMR measurements: heteronuclear single quantum correlation (HSQC) and heteronuclear multi-quantum correlation (HMBC) experiences. Finally, through-space correlations between protons close to each other are studied by nuclear

Overhauser effect spectroscopy (NOESY) or rotational Overhauser effect spectroscopy (ROESY). These techniques are the centrepiece of structure determination using NMR spectrometry.

However, fractionation of the extract prior to its isolation is necessary for the NMR analysis. Liquid chromatography coupled with NMR detection (LC-NMR) has become an important technique for food and natural products analysis and may allow the complete assignment and structure determination of individual metabolites without the need of their isolation.

Ideally, the use of hyphenated chromatographic techniques coupled to mass and NMR spectrometry should allow the complete spectrometry characterization of different compounds in a mixture in a single analysis (Fig. 2.6). In practice, these techniques offer a rapid way for characterizing new unknown metabolites or for dereplicating known analytes. However, some structure details will remain undetermined.

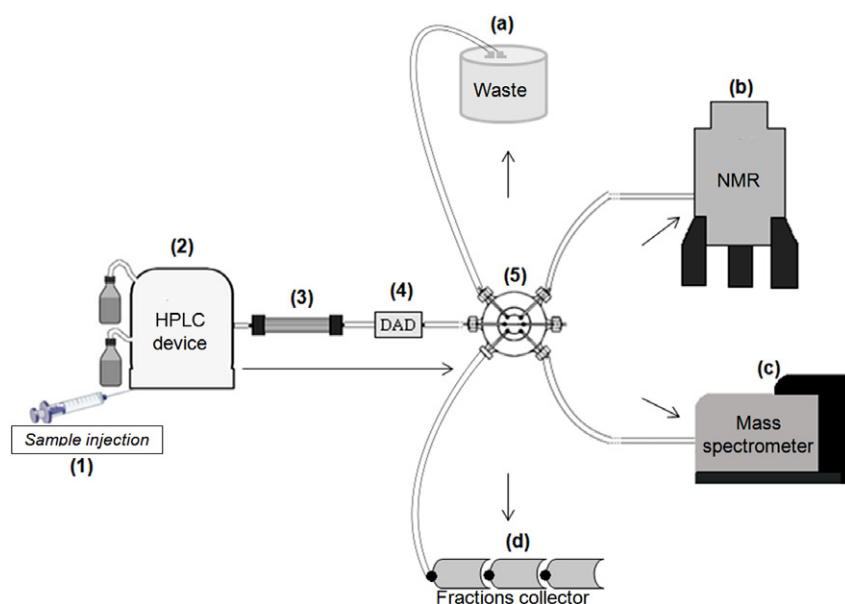


Figure 2.6 Layout of hyphenated acquisitions. The sample is injected (1) by the pump inside the HPLC device (2). It is thus micro-fractionated by elution through the inverse phase column (3). Exiting peaks are then detected by the DAD (4) and directed towards a splitting valve (5). The user can then choose whether he wants to direct the peak towards the waste container (a) or towards the fractions collector (d). If the peak has to be analysed, it can be injected into the NMR flow-cell for structure elucidation (b) or towards the mass spectrometer for further ionization and mass analysis (c).

In general terms, LC–MS is used as a first dereplication step for the chemical profiling of crude plant extracts. Compounds are tentatively identified based on the comparison of their molecular weight and fragment information with those recorded into natural product libraries. LC–NMR is mainly used in a second step for a more detailed structural investigation of compounds presenting original structural features or displaying interesting activities according to previously performed bioassays (Fig. 2.7).



4. LC–NMR TECHNIQUES

4.1. LC–NMR spectrometry in natural product identification

NMR is a technique of choice to quickly determine the complete structure of natural compounds. The coupling of this technique with the HPLC high separative abilities allows an online and complete identification of compounds present in a vegetal extract (Emerson et al., 2007; Exarchou et al., 2005; Silva Elipe, 2003; Sturm & Seger, 2012; Wolfender et al., 2001). LC–NMR provides that information without needing a particular handling to treat the eluted peak for an NMR analysis. This is why LC–NMR is a technique under a constant development since its first uses at the end of the 1970s (Watanabe & Niki, 1979).

Coupling HPLC with NMR requires some modifications on the NMR detector's hardware. It is indeed necessary to use a particular probe connected to the HPLC capillary. This probe is called an LC–NMR probe and commonly has an internal volume ranged from 60 to 220 μL . Acquisitions in LC–NMR can be realized through several acquisition modes (Fig. 2.8).

4.2. Principal modes of acquisition for LC–NMR

4.2.1 On-flow and stop-flow acquisition

4.2.1.1 On-flow mode

The mode of acquisition based on on-flow LC–NMR experiments is the most basic one (Spring et al., 1995; Wolfender, Rodriguez, Hostettmann, & Hiller, 1997). It consists of setting online an HPLC apparatus and an NMR detector. The sample eluted with a deuterated solvent is transferred directly and uninterruptedly towards the NMR detection flow-cell (Fig. 2.8). This continuous elution implies that the exposure of an elution peak within the detection cell has a very short duration, approximately 3.6 s, with a flow of 1 mL/min using a 4.6-mm column (Silva Elipe, 2003).

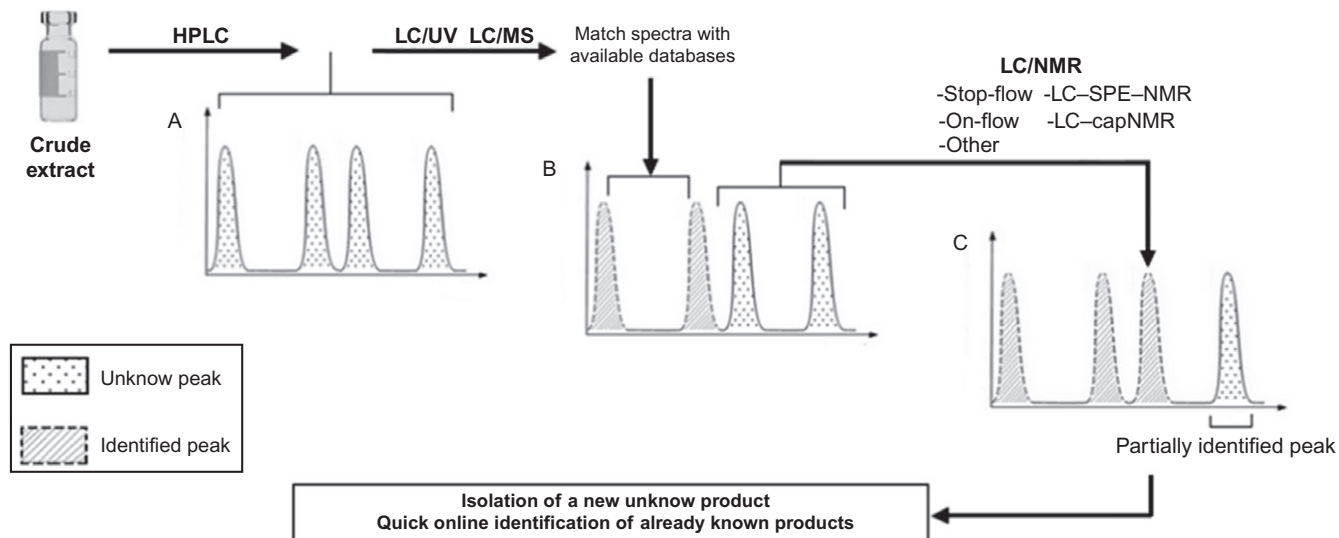


Figure 2.7 Sample peaks dereplication and NMR use optimization. The crude extract is micro-fractionated after a run through HPLC. Several peaks need then to be identified (A). Using LC/UV or LC/MS provides data on the peak's compounds. Those data can be compared to the available databases in order to identify the peaks corresponding to already known compounds (B). Only the peaks that are still unidentified need to be analysed by NMR. NMR spectroscopy can provide additional data, which will help in identifying those peaks (C) through matching with the databases. Nevertheless, some peaks will not be identified by this way, indicating that they potentially contain a new unknown compound. This step-by-step analysis allows a quick on-line identification of known products and isolation of an unknown one, which can be then studied deeper.

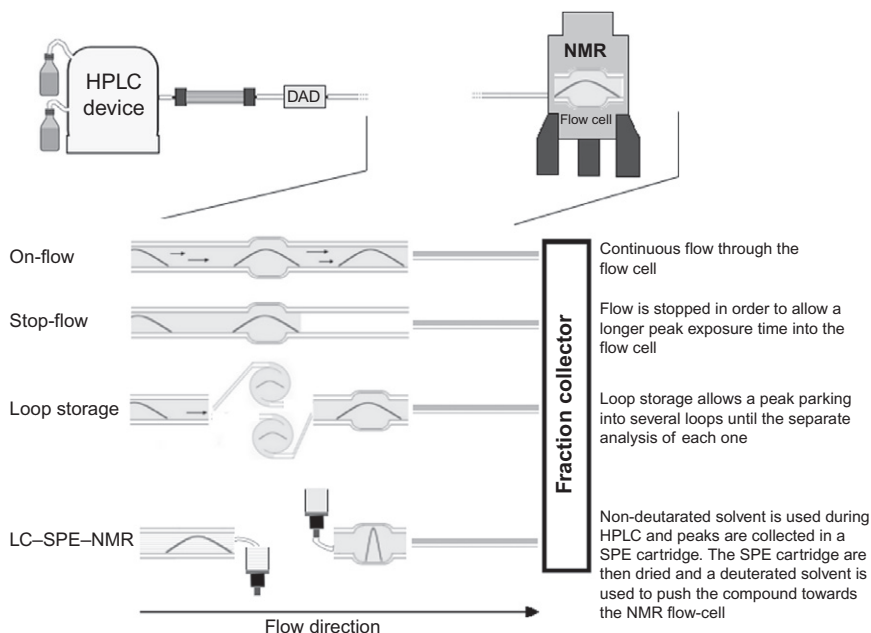


Figure 2.8 LC-NMR and acquisition techniques.

On-flow LC-NMR measurements were recorded successfully for secondary metabolites characterization in various natural product extracts. Spring et al. report the identification of sesquiterpene lactones and flavanones by the combination of LC-MS and on-flow LC-RMN mode techniques in plant extracts (Spring et al., 1995, Spring, Heil, & Vogler, 1997). For example, in *Zaluzania grayana*, application of on-flow LC-NMR allowed the identification of three major compounds in the microgram range by the observation of ^1H NMR spectra. Concerning alkaloids, in *Erythroxylum vacciniifolium*, on-flow LC- ^1H NMR data allowed the identification of five main alkaloids of the crude extract (Zanolari et al., 2003). With regard to phenolic compounds, on-flow LC-NMR analysis was successfully used. In order to rapidly identify the active compounds from *Blumea gariepina* extracts on-flow LC- ^1H NMR spectra were recorded (Queiroz et al., 2005). Eight compounds were identified including flavonoid derivatives. Online couplings of LC-NMR and LC-MS were used to identify secondary metabolite products of *Streptomyces violaceoruber* (Pham, Vater, Rotard, & Mügge, 2005). Eight main compounds were identified by the combination of on-flow LC- ^1H NMR experiments and offline 2D-NMR spectrometry. In particular, on-flow

LC- ^1H NMR experiments allow the direct identification of some flavonoids such as daidzein and genistein.

Nevertheless, NMR is a poorly sensitive method of detection: (i) acquisitions in LC-NMR are thus limited to the only ^1H or ^{19}F spectra (Ghosh & Konishi, 2007) and (ii) only the major peaks of the mixture are correctly detected. Moreover, the detection sensitivity lowers as the width of the elution peak increases. Indeed, only a fraction of the elution peak is observed by the NMR detector if the peak width is larger than the flow-cell capacity, implying that only part of the compound's eluted quantity is analyzed. This limited exploitation of the peak is a cause of sensitivity loss. Another disadvantage of this acquisition mode is the need for carrying out the removal of solvent signal, causing then the loss of analyte signals if this last is masked by the solvent. A solution used is the acquisition of NMR data in the presence of two different solvents during two independent experiments. The two solvent signals parasitize the spectra at different chemical shifts, but superposing the two spectra allows the deduction of a hypothetical third spectrum that has the entirety of the analyte signals (Ndjoko, Wolfender, Röder, & Hostettmann, 1999). The acquisitions results are presented in the shape of 2D graphic. One of the two dimensions of the graph is represented by a scale of time to which are associated elution times of each peak, and each elution time is matched with its 1D-NMR spectra.

One must notice that the on-flow mode is dedicated to analyze high abundance constituents of mixture by acquiring ^1H or ^{19}F NMR data. Currently, this mode is not used for secondary metabolites identification because of its limitations. Indeed, the acquisition methods development in LC-NMR made it possible to decrease the peaks width and to transfer more important concentrations of analyte within the flow-cell. These improvements increased LC-NMR sensitivity and also allowed to record more complete NMR experiments by carrying out, for example, 2D correlation spectra on the peaks of interest.

4.2.1.2 Stop-flow mode

By using stop-flow mode, it is possible to considerably increase the exposure time of the elution peak within the flow-cell. Realizing acquisitions in stop-flow mode requires the connection of a UV-Vis or diode array detector (DAD), between the HPLC and the NMR devices (Fig. 2.8). When a peak leaves the HPLC column, it is detected by the DAD. The duration necessary to the passage of this peak from the column exit until the arrival within the NMR probe's flow-cell is recorded. By knowing the value of this delay, it is

possible to stop the elution after the peak detection by the DAD. The peak can then be parked into the LC–NMR probe cell for up to few days. This long duration exposure to NMR detection allows enhancing the number of acquisitions, thus increasing considerably the signal-to-noise ratio. It also allows carrying out 2D-NMR experiments (Bringmann, Wohlfarth, Rischer, Schlauer, & Brun, 2002; Schefer et al., 2006), which can lead to obtain additional details about the structure of the analyte presented in the elution peak.

Stop-flow mode is generally used when metabolite quantity is reasonable or for unstable compounds. To illustrate this mode, the analysis of major metabolites of vine stalk extract is presented (Fig. 2.9). The extract was eluted with a gradient of deuterated water (A) and acetonitrile (B) according to the following gradient program (v/v): 0 min 85% A 15% B, 15 min 100% B. The column was a ProntoSil C₁₈ (5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm), and flow rate was typically 0.6 mL/min. ¹H NMR spectra were acquired in stopped-flow mode. Solvent suppression was achieved by a one-dimensional version of the NOESY pulse sequence with presaturation during the relaxation delay and mixing time at two frequencies simultaneously. ¹H NMR spectra (Fig. 2.10) on the LC–NMR system (Bruker Avance III 600 MHz equipped with equipped with an ¹H–¹³C inverse-detection flow probe with an active volume of 120 μ L) revealed the presence of two phenolic compounds belonging to the stilbene family: resveratrol (1) and ϵ -viniferin (2).

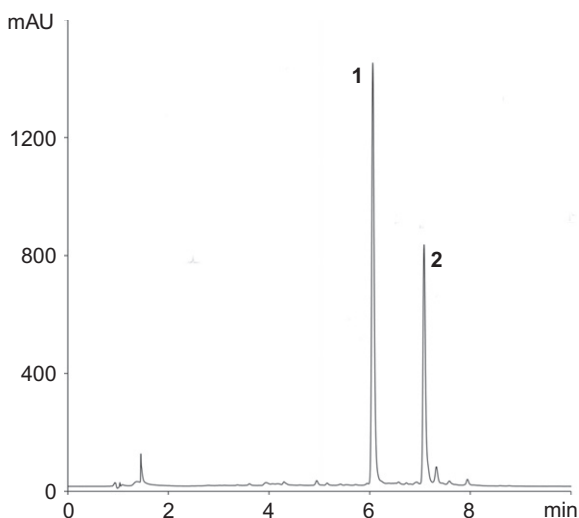


Figure 2.9 HPLC chromatograms in vine stalk extract recorded at a signal of 360 nm.

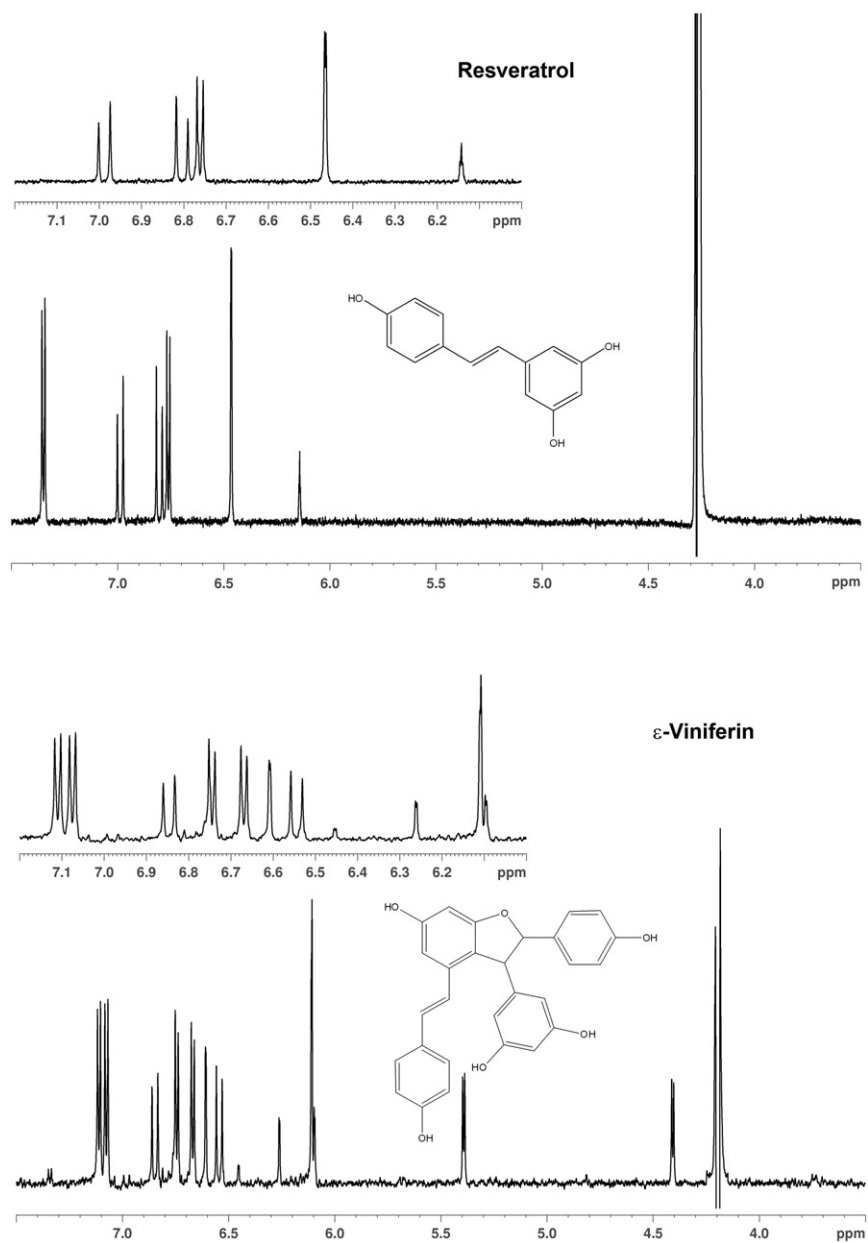


Figure 2.10 LC- ^1H NMR spectra of resveratrol (**1**) and ϵ -viniferin (**2**) in stop-flow mode.

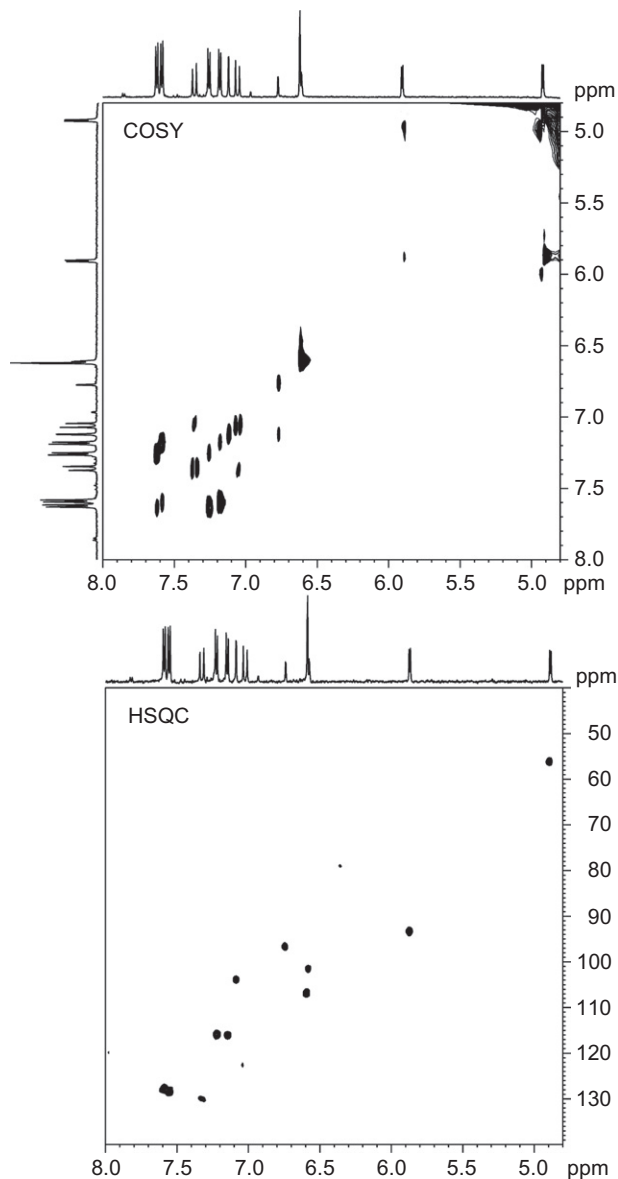


Figure 2.11 COSY and HSQC spectra of ϵ -viniferin (**2**) in stop-flow mode.

To confirm identification of ϵ -viniferin, 2D-NMR experiments were realized (including COSY, ROESY and HSQC) on the LC-NMR system over night. COSY and HSQC experiments were presented in [Fig. 2.11](#). Solvent suppression was achieved by using shaped pulse for off-resonance

presaturation. This illustration emphasizes the relevance of stop-flow experiments for structural analyses of secondary metabolites. This mode is widely used for natural products and pharmaceutical investigations (Elipe, Huskey, & Zhu, 2003; Iwasa et al., 2003; Stintzing, Conrad, Klaiber, Beifuss, & Carle, 2004).

Stop-flow LC–NMR experiments were developed for characterizing alkaloids in various plant extracts. Combination of stop-flow LC– ^1H NMR and LC–MS analysis was applied for identifying new unstable iridoid glycosides and for monitoring their transformations (Cogne et al., 2003, 2005). Stop-flow LC– ^1H NMR and LC–2D–NMR measurements (COSY experiences) have been recorded for the analysis of carotenoids in food products such as palm oil, tomato, mandarin or orange juices (Tode, Maoka, & Sugiura, 2009). In this study, various kinds of carotenoids were identified by comparing NMR spectra with those of standard. In *Ancistrocladus griffithii* extracts, 2D–NMR experiments, such as TOCSY and ROESY, were recorded to characterize new monomeric naphthylisoquinoline alkaloids. Stop-flow LC–NMR has been successfully applied in the phytochemical investigation of *Laurencia filiformis* a marine organism (Dias, White, & Urban, 2009). Several sesquiterpenes were identified and their online chemical conversions monitored. In combination with 2D–NMR experiments, stop-flow LC– ^1H NMR measurements allowed the identification of new chamigenes and sesquiterpenes in Australian marine alga *Laurencia elata* (Dias & Urban, 2011). Concerning phenolic compounds, several classes have been successfully characterized by stop-flow LC–NMR such as phenolic acids, flavonoids, stilbenes, or lignans (de Rijke, de Kanter, Ariese, Brinkman, & Gooijer, 2004; Qu et al., 2008; Timmers & Urban, 2012; Zhao et al., 1999). In *Torreya jackii* extract, seven lignans were analyzed by stop-flow LC– ^1H NMR analysis (Zhao et al., 1999). The structures were confirmed thanks to conventional NMR measurements. Stop-flow LC–NMR analysis was performed for identifying isoflavone glucoside malonates in *Trifolium pratense* (de Rijke et al., 2004). Complete compound determination was achieved by offline COSY and NOESY experiments to determine the positions of the glucose moiety.

The analysis of each peak implies stopping the elution at each time. Many stops and long detection duration can give place to a diffusion phenomenon within the column and the NMR flow-cell (Keifer, 2010). This passive diffusion can cause a widening of the elution peaks, having then negative effects on the recorded spectrum quality. However, this resolution loss seems to have weak incidences (Wolfender et al., 2001).

An often used technique in order to optimize this mode of acquisition is the loop-storage-assisted acquisition (Tseng, Braumann, Godejohann, Lee, & Albrecht, 2000). Each peak is collected and stored in a capillary loop for a later analysis by NMR (Fig. 2.8). Peaks collection can be thus created and each one will be then isolated, preventing from any dilution or mixing phenomenon. That also avoids undergoing the diffusion phenomenon in the HPLC column and in the capillary. This technique is adapted for the simultaneous analysis of several components from the same extract.

These two traditional methods of stop-flow and loop-collection suffer from several limitations that impact the spectra quality. However, it is possible to largely improve the acquisitions sensitivity while refining the peaks width and decreasing the quantity of biological material. This last parameter is particularly important during the secondary metabolites analysis.

4.2.2 LC-SPE-NMR

LC-SPE-NMR is a mode of acquisition first described by Exarchou, Godejohann, van Beek, Gerotheranassis, and Vervoort (2003). When analyte concentration is too low, the sensitivity of the LC–NMR precludes its structure determination. A solution to this problem consists in inserting a solid-phase extraction (SPE) apparatus between the HPLC system and the NMR spectrometer in order to trap and accumulate the compounds onto SPE cartridges (Fig. 2.8). The matrix of those cartridges is usually hydrophobic when it is about phytochemical compounds studies. Depending on compound classes, different cartridge can be used such as GP (general phase, a polystyrene-type polymer) or C18 phase (Lambert, Stærk, Hansen, & Jaroszewski, 2005). Each compound can be eluted with a specific deuterated solvent before being trapped into the NMR probe.

Basically, the detected peak exiting from the column is diluted by water, in order to induce the analyte adsorption on the matrix, and then transferred towards the SPE. The cartridge is then dried by nitrogen in order to eliminate chromatographic solvents. Lastly, a deuterated elution solvent is used to inject the peak towards the flow-cell for NMR analysis.

This method thus makes it possible to pre-concentrate the analyte present in the peak inside a low volume of deuterated solvent; this volume can be about the capacity of the NMR flow-cell. The pre-concentration provide peaks sharper than those obtained at the HPLC column exit (Jaroszewski, 2005). The entirety of the peak will be thus analyzed by the LC–NMR flow-cell, which results in better detection results. LC-SPE-NMR thus also prevents from using deuterated solvents in great and

expansive quantity during the liquid chromatography. Exchanging solvents volume and/or nature at the column exit has other advantages; it becomes possible to use a more suitable solvent for the NMR detection. Moreover, the injection of a lower solvent volume in the LC–NMR probe considerably reduces the issues than one can meet during the removal of the solvent signal.

A major asset of acquisitions through LC–SPE–NMR is the possibility to increase the detectable analyte mass through numerous trappings of the same peak on the same SPE cartridge. Successive injections are carried out and the analyte peak is each time trapped on the same cartridge. The spectrum quality can be then improved thanks to the availability of more analyte quantity inside the LC–NMR probe.

The secondary metabolites are often minor metabolites within the vegetal extract. Thus it is often necessary to use great extract volume and quantity in order to be able to work with sufficient metabolites quantities for NMR detection. This can involve an overload of the HPLC column. LC–SPE–NMR allows splitting the extract volume while making it possible to recover an identical quantity, if not higher, of secondary metabolite at the end of the successive injections of the volume fractions.

LC–SPE–NMR offers several advantages compared to the other more conventional techniques. Nevertheless, an essential parameter to take into account during the use of this method is the choice the elution solvent and the nature of the matrix (Clarkson, Madikane, Hansen, Smith, & Jaroszewski, 2007). Those have to be appropriated to the studied analyte. Indeed it can happen that the analyte is retained too little or too much within the matrix, involving consequent elution issues.

To date LC–SPE–NMR is widely used in natural products investigations. Numerous studies have been successfully conducted by using this technique. Various terpenoids (including diterpenes, iridoids and sesquiterpenes) have been successfully investigated by LC–SPE–NMR (Clarkson, Hansen, Smith, & Jaroszewski, 2006a, 2006b; Clarkson et al., 2007; Sorensen et al., 2006). LC–SPE–NMR measurements allowed the identification of new tricyclic diterpenes in *Harpagophytum procumbens* crude extracts (Clarkson et al., 2006a). Structure elucidations were achieved by using ^1H NMR, NOESY and HMBC spectra. NOESY and HMBC spectra were recorded in the LC–SPE–NMR mode by multi-trapping (ten and eight trappings, respectively). NOESY and HMBC measurement allowed the structural identification of these secondary metabolites by unequivocal

assignment of all signals. Numerous alkaloids, such as isomeric tropane alkaloids, have been identified by LC–SPE–NMR experiments (Staerk et al., 2009; Sturm, Seger, Godejohann, Spraul, & Stuppner, 2007). Concerning phenolic constituents of plant extracts, in Greek *Hypericum perforatum*, Tatsis et al. have reported the identification of several complex compounds including naphthodianthrones, phloroglucinols, flavonoids and phenolic acids (Tatsis et al., 2007). Direct analysis by LC–SPE–NMR analysis of the polar part of olive oil permitted structure elucidation of simple phenols, lignans and flavonoids (Christophoridou, Dais, Tseng, & Spraul, 2005). In greek oregano, multiple flavonoids have been successfully identified (Exarchou et al., 2003). 2D–NMR experiments were acquired in this study including homonuclear TOCSY and heteronuclear HMQC and HMBC experiments, thanks to the multiple trapping on the same SPE cartridge.

4.2.3 Other acquisition techniques

4.2.3.1 CapLC–NMR

NMR probes are characterized by their mass sensitivity, which is a parameter directly related to the signal-to-noise ratio. Mass sensitivity is inversely proportional to the detection coil volume. This link can be explained by the fact that the transverse magnetic field intensity per volume unit is more important within a detection coil of small size (Ghosh & Konishi, 2007). The capLC–NMR is a method in which the traditional LC–NMR probe is replaced by a capillary presenting a zone of detection of 1.5 μL surrounded by a small detection coil (Wolfender, Queiroz, & Hostettmann, 2005). The eluted peaks are collected in 96-well plates before being dried by evaporation. The analyte remaining in the wells are then diluted with an appropriated deuterated solvent and finally injected towards the capLC–NMR probe. A push volume of solvent is used to maintain the peak in the centre of the microcoil.

Numbers of studies have established that high throughput analysis based on capLC–NMR leads to a way better spectra quality when compared to those obtained through other acquisition modes (Exarchou et al., 2005). Another advantage is that a reduced amount of analyte is needed for this kind of NMR detection, approximately 10 μg (Xu & Alexander, 2005). A discussable disadvantage of capLC–NMR is the transfer efficiency between the HPLC apparatus and the capLC–NMR probe. Nevertheless fully automated capLC–capNMR experiences are possible (Jansma et al., 2005), where the transfer seems to be sufficiently efficient.

Improving the NMR instrumentation with a home-made capLC–NMR instrumentation allowed to separate and identify four terpenoids with only 25 nmol of each one using ^1H NMR. A home-made capNMR probe was then made by wrapping a detection capillary with a flat copper wire, which lead to an NMR observable volume of 1.1 μL . The liquid chromatography capillaries were then transferred to this improved microcoil (Lacey, Tan, Webb, & Sweedler, 2001).

Concerning polyphenols, LC–capNMR was able to provide great quality spectrum with using only thirty micrograms of each compound (Xiao, Krucker, Putzbach, & Albert, 2005). Passing this quantity through a 1.5- μL active-volume capillary within the microprobe allowed identifying four isoflavones in *Radix astragali* by using ^1H capNMR–LC experiments.

Alkanoids were also studied through LC–capNMR. A library of taxol-derivatives molecules have been fully dereplicated by analyzing 5–10 μg of compounds by COSY-based experiments. A 1.5- μL capillary flow-probe was then used. For additional experiment in order to determine unknown compounds structure, 50 μg were used for HMQC and HMBC experiments (Eldridge et al., 2002).

4.2.3.2 Column-trapping

Pre-concentrating the peak of elution is a method that increases the quantity of material seen within the volume of the coil, increasing significantly the NMR signal quality. Column-trapping is a parallel method to the SPE that also provides pre-concentrated analyte. The column trapping was described by Djukovic, Liu, Henry, Tobias, and Raftery (2006); it is based on the connection of a second chromatography column into the LC–RMN system. Peaks eluted out of the first column, with a non-deuterated solvent, are stored in a loop. A syringe pushes then a peak out of the loop towards a second column using 90% deuterated water and 10% deuterated acetonitrile solvents. This mixture aims to decrease the peak organic solvents concentration. Once the peak has entered into the column, a syringe injects a 10%-water and 90%-deuterated acetonitrile solvent. This high concentration in acetonitrile allows rushing the analyte into the second column, eluting it into a more concentrated sharper peak. This peak is then transferred towards the NMR detector. The column trapping improves the signal by a factor 15 (Djukovic et al., 2006), compared to factor ranging between 8 and 30 for SPE (Xu & Alexander, 2005). This method also allows avoiding the use of deuterated solvents during the liquid chromatography.



5. COMBINATION OF LC–MS AND LC–NMR IN METABOLITE PROFILING

In many cases, the LC–NMR analyses are performed independently from the LC–MS runs. LC–MS is used as a first dereplication step for the chemical profiling of plant extracts and compounds are tentatively identified based on their molecular weight and fragment information after a manual search in the secondary metabolite libraries. LC–NMR is mainly used in a second step for a more detailed structural investigation of compounds presenting original structural features.

To illustrate this methodology, the obtained results concerning composition of anthocyanins in various *Vitis* are presented. Based on LC–MS and LC–NMR data, it was possible to identify a total of 33 compounds in the different extracts (Acevedo De la Cruz et al., 2012). Anthocyanins have simple structures deriving from five anthocyanidins: cyanidin, delphinidin, petunidin, peonidin and malvidin (Fig. 2.12). Nevertheless, the glycosylation pattern of grape anthocyanins could be complex. In wild *Vitis*, glycosylation could occur at both the 3- and 5-positions giving complex structures.

LC–MS experiments give crucial structural information about each structure. MS/MS mode provides information on the aglycone and its corresponding sugar due to the observed m/z characteristic fragmentation values (Fig. 2.13). Moreover, observation of MS data indicates the presence of some substituent groups, such as *p*-coumaroyl or acetyl units. LC–MS is a rapid and cost-effective technique for the identification of secondary metabolites. Nevertheless, mass data alone do not allow the complete structure elucidations. Isomers, such as *cis*- and *trans*-coumaroyl-glucosides derivatives, cannot be differentiated from each other only based on mass measurements.

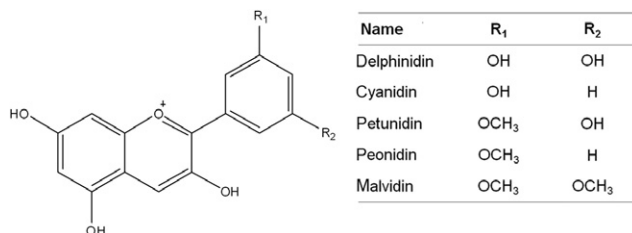


Figure 2.12 Chemical structures of anthocyanin aglycones in vine.

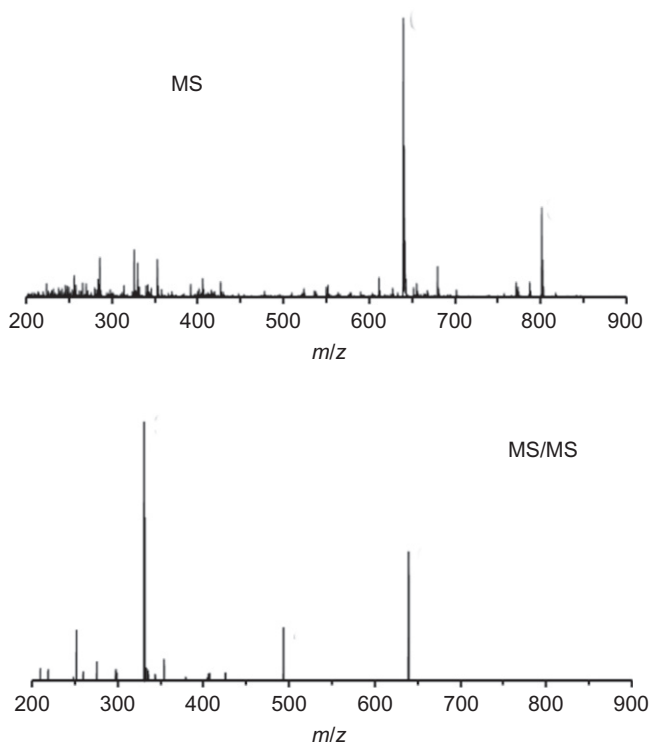


Figure 2.13 Mass spectra of *trans*-malvidin-3-*O*-(6-*O*-*p*-coumaryl)-5-*O*-diglucoside.

To complete structure elucidation, NMR experiments were performed by means of stop-flow LC–NMR and 2D–NMR in accordance with the results of LC–MS. Prior ^1H NMR spectra were recorded by using stop-flow mode (Fig. 2.14). As previously mentioned, NMR experiments were performed on a Bruker 600-MHz spectrometer equipped with an inverse-detection flow probe. The flow rate was typically 0.6 mL/min. Fractions were eluted with a gradient of deuterated water (A), acetonitrile–0.25% TFA (B) and water–0.25% TFA (C) according to the following gradient program (v/v): 0 min 30% A 10% B, 60% C, 55 min 30% A 55% B, 15% C, 60 min 100% B linear for 10 min, followed by 10 min for re-equilibration. Deuterated water flow was maintained constant to facilitate shimming process. By comparison of ^1H NMR data with reference compounds and with literature data, the complete identification of the major part of the anthocyanins was achieved.

However, when the concentration of the eluted compound was not in sufficient quantity, the sensitivity of LC–NMR prevented further

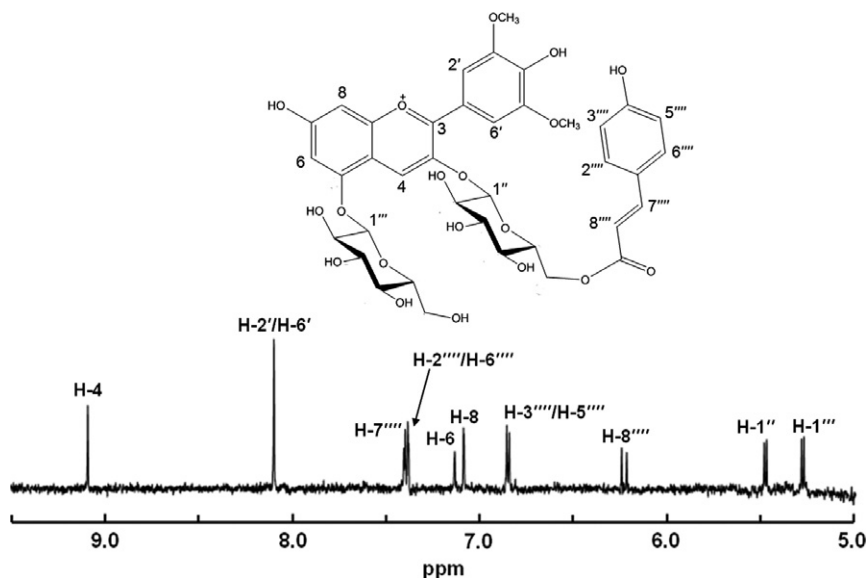


Figure 2.14 ^1H NMR spectrum of *trans*-malvidin-3-O-(6-O-*p*-coumaryl)-5-O-diglucoside.

2D-NMR experiments such as COSY or ROESY experiments. LC-SPE-NMR method was applied in order to obtain minor compounds spectra or to complete structure identification by mean of 2D-NMR experiments. Each unknown compound was trapped onto SPE cartridges, concentrated and eluted into NMR probe with deuterated solvent. Fractions were eluted with the same gradient condition as for stop-flow mode without deuterated water.

Nevertheless, the trapping conditions constituted a critical factor, in particular with polar compounds like anthocyanins. Moreover, despite the multiple trapping, it was not possible to accumulate enough amount of each anthocyanin to successfully perform more sophisticated 2D-NMR experiments for unambiguous spectral and structural assignment. To solve this problem, ambiguous or new compounds were directly collected after on-flow ^1H LC-NMR analysis onto an Isco Foxy fraction collector, lyophilized and subsequently analyzed with a classical NMR probe. This workflow allowed multiple collections according to ^1H LC-NMR spectra; deuterated solvent of choice was able to use and 2D-NMR was able to perform.

Anthocyanin identification by NMR was based on protocol of [Andersen and Fossen \(2003\)](#). To illustrate how the structure of a relatively complex

anthocyanin is elucidated by ^1H NMR and 2D-NMR spectra, the detailed procedure applied on the *trans*-malvidin-3-*O*-(6-*O-p*-coumaryl)-5-*O*-diglucoside is described below. The ^1H NMR spectrum of *trans*-malvidin-3-*O*-(6-*O-p*-coumaryl)-5-*O*-diglucoside shows six resonances in accordance with the aglycone malvidin (Fig. 2.14). The singlet at δ 9.10 ppm is typical of the H-4 of most aglycones. The two signals at δ 7.14 and 7.11 ppm assigned to H-6 and H-8, respectively, have a *meta*-coupling to each other ($^4J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz). The 2H singlet at 8.10 ppm assigned to H-2' and H-6', indicate an anthocyanin with a symmetrically substituted ring. The 6H singlet at δ 4.12 ppm of the two *O*-methyl groups confirmed the identity of the aglycone to be malvidin. With regard to the sugar moiety, the anomeric protons are considerably downfield of the other sugar resonances, and thus the two doublets at δ 5.48 (H-1'', $^4J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz) and 5.28 ppm (H-1''', $^4J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz) together with integration data, indicate two monosaccharides. The chemical shifts together with ^1H - ^1H coupling constants are in agreement with two β -glucopyranosyl units. COSY and TOCSY spectra were recorded to assign the protons of sugar units. Finally, concerning the coumaroyl moiety, the two signals at δ 7.40 and 6.24 ppm assigned to H-7'''' and H-8''''', respectively, have large coupling constants ($^3J_{\text{HH}} = 16.1$ Hz), indicating *p*-coumaric acid to have the *trans* configuration. NOESY experiments were recorded to confirm the connection sites between the glucose units, the aglycone moiety and between the *p*-coumaric acid.



6. CONCLUSION

Online LC-MS and LC-NMR synergic combination techniques have been shown in several studies to be a successful tool for the characterization of complex plant extracts. These techniques provide efficient structure identification without preliminary isolation and purification steps for the three major classes of secondary metabolites: terpenoids, alkaloids and phenolic compounds.

Development of LC-NMR techniques yields to structural identification by reducing to a minimum the restrictions of NMR such as solvent cost and sensitivity. For identification of major analytes in the extract, stop-flow mode provides appropriate NMR data. For complete identification of minor compounds needing 2D-NMR measurements, LC-SPE-NMR or capLC-NMR techniques are necessary. Each technique has advantages and limitations; the aims of the analysis lead the choice of the appropriated LC-NMR mode to solve the structural issues.

REFERENCES

- Acevedo De la Cruz, A., Hilbert, G., Rivière, C., Mengin, V., Ollat, N., Bordenave, L., et al. (2012). Anthocyanin identification and composition of wild *Vitis* spp. accessions by using LC–MS and LC–NMR. *Analytica Chimica Acta*, 732, 145–152.
- Andersen, Ø. M., & Fossen, T. (2003). Characterization of anthocyanins by NMR. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York: John Wiley & Sons Inc.
- Bohlmann, J., Meyer–Gauen, G., & Croteau, R. (1998). Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(8), 4126–4133.
- Bringmann, G., Wohlfarth, M., Rischer, H., Schlauer, J., & Brun, R. (2002). Extract screening by HPLC coupled to MS–MS, NMR, and CD: A dimeric and three monomeric naphthylisoquinoline alkaloids from *Ancistrocladus griffithii*. *Phytochemistry*, 61(2), 195–204.
- Christophoridou, S., Dais, P., Tseng, L.-H. , & Spraul, M. (2005). Separation and identification of phenolic compounds in olive oil by coupling high–performance liquid chromatography with postcolumn solid-phase extraction to nuclear magnetic resonance spectroscopy (LC–SPE–NMR). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12), 4667–4679.
- Clarkson, C., Hansen, S. H., Smith, P. J., & Jaroszewski, J. W. (2006a). Discovering new natural products directly from crude extracts by HPLC–SPE–NMR: Chinane diterpenes in *Harpagophytum procumbens*. *Journal of Natural Products*, 69(4), 527–530.
- Clarkson, C., Hansen, S. H., Smith, P. J., & Jaroszewski, J. W. (2006b). Identification of major and minor constituents of *Harpagophytum procumbens* (Devil's Claw) using HPLC–SPE–NMR and HPLC–ESIMS/APCIMS. *Journal of Natural Products*, 69(9), 1280–1288.
- Clarkson, C., Madikane, E. V., Hansen, S. H., Smith, P. J., & Jaroszewski, J. W. (2007). HPLC–SPE–NMR characterization of sesquiterpenes in an antimycobacterial fraction from *Warburgia salutaris*. *Planta Medica*, 73(6), 578–584.
- Cogne, A. L., Queiroz, E. F., Marston, A., Wolfender, J. L., Mavi, S., & Hostettmann, K. (2005). On-line identification of unstable iridoids from *Jamesbrittenia fodina* by HPLC–MS and HPLC–NMR. *Phytochemical Analysis*, 16(6), 429–439.
- Cogne, A. L., Queiroz, E. F., Wolfender, J. L., Marston, A., Mavi, S., & Hostettmann, K. (2003). On-line identification of unstable catalpol derivatives from *Jamesbrittenia fodina* by LC–MS and LC–NMR. *Phytochemical Analysis*, 14(2), 67–73.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). In B. Buchanan, W. Gruissem, & R. Jones (Eds.), *Biochemistry & molecular biology of plants* (pp. 1250–1318). Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiologists.
- de Rijke, E., de Kanter, F., Ariese, F., Brinkman, U. A., & Gooijer, C. (2004). Liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance spectroscopy for the identification of isoflavone glucoside malonates in *T. pratense* L. leaves. *Journal of Separation Science*, 27(13), 1061–1070.
- Dias, D. A., & Urban, S. (2011). Phytochemical studies of the southern Australian marine alga, *Laurencia elata*. *Phytochemistry*, 72(16), 2081–2089.
- Dias, D. A., White, J. M., & Urban, S. (2009). *Laurencia filiformis*: Phytochemical profiling by conventional and HPLC–NMR approaches. *Natural Product Communications*, 4(2), 157–172.
- Djukovic, D., Liu, S., Henry, I., Tobias, B., & Raftery, D. (2006). Signal enhancement in HPLC/microcoil NMR using automated column trapping. *Analytical Chemistry*, 78(20), 7154–7160.
- Dubey, V., Bhalla, R., & Luthra, R. (2003). An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *Journal of Biosciences*, 28(5), 637–646.

- Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D., & Rohdich, F. (2004). Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 61(12), 1401–1426.
- Eldridge, G. R., Vervoort, H. C., Lee, C. M., Cremin, P. A., Williams, C. T., Hart, S. M., et al. (2002). High-throughput method for the production and analysis of large natural product libraries for drug discovery. *Analytical Chemistry*, 74(16), 3963–3971.
- Elipe, M. V. S., Huskey, S.-E. W., & Zhu, B. (2003). Application of LC-NMR for the study of the volatile metabolite of MK-0869, a substance P receptor antagonist. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30(5), 1431–1440.
- Emerson, Q., Kurt, H., & Jean-Luc, W. (2007). Development and application of LC-NMR techniques to the identification of bioactive natural products. In *Bioactive Natural Products* (pp. 143–190). FL USA: Taylor & Francis group.
- Exarchou, V., Godejohann, M., van Beek, T. A., Gerothanassis, I. P., & Vervoort, J. (2003). LC-UV-solid-phase extraction-NMR-MS combined with a cryogenic flow probe and its application to the identification of compounds present in Greek Oregano. *Analytical Chemistry*, 75(22), 6288–6294.
- Exarchou, V., Krucker, M., van Beek, T. A., Vervoort, J., Gerothanassis, I. P., & Albert, K. (2005). LC-NMR coupling technology: Recent advancements and applications in natural products analysis. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 43(9), 681–687.
- Garcia-Beneytez, E., Cabello, F., & Revilla, E. (2003). Analysis of grape and wine anthocyanins by HPLC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(19), 5622–5629.
- Gershenzon, J., & Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*, 3(7), 408–414.
- Ghosh, D., & Konishi, T. (2007). Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: Role in diabetes and eye function. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16(2), 200–208.
- Guerrero, R. F., Liazid, A., Palma, M., Puertas, B., González-Barrio, R., Gil-Izquierdo, Á., et al. (2009). Phenolic characterisation of red grapes autochthonous to Andalusia. *Food Chemistry*, 112(4), 949–955.
- Hossain, M. B., Rai, D. K., Brunton, N. P., Martin-Diana, A. B., & Barry-Ryan, C. (2010). Characterization of phenolic composition in Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10576–10581.
- Iwasa, K., Kuribayashi, A., Sugiura, M., Moriyasu, M., Lee, D.-U., & Wiegrebbe, W. (2003). LC-NMR and LC-MS analysis of 2,3,10,11-oxygenated protoberberine metabolites in *Corydalis* cell cultures. *Phytochemistry*, 64(7), 1229–1238.
- Jansma, A., Chuan, T., Albrecht, R. W., Olson, D. L., Peck, T. L., & Geierstanger, B. H. (2005). Automated microflow NMR: Routine analysis of five-microliter samples. *Analytical Chemistry*, 77(19), 6509–6515.
- Jaroszewski, J. W. (2005). Hyphenated NMR methods in natural products research, part 2: HPLC-SPE-NMR and other new trends in NMR hyphenation. *Planta Medica*, 71(9), 795–802.
- Kaufman, P., Briellmann, H., Cseke, L., Setzer, W., & Kirakosyan, A. (2006). Phytochemicals. In L. Cseke, A. Kirakosyan, P. Kaufman, S. Warber, J. Duke, & H. Briellmann (Eds.), *Natural Products from Plants* (2nd ed., pp. 1–49). FL USA: Taylor & Francis group.
- Keifer, P. A. (2010). Chemical-shift referencing and resolution stability in methanol:water gradient LC-NMR. *Journal of Magnetic Resonance*, 205(1), 130–140.
- Lacey, M. E., Tan, Z. J., Webb, A. G., & Sweedler, J. V. (2001). Union of capillary high-performance liquid chromatography and microcoil nuclear magnetic resonance spectroscopy applied to the separation and identification of terpenoids. *Journal of Chromatography. A*, 922(1–2), 139–149.

- Lambert, M., Stærk, D., Hansen, S. H., & Jaroszewski, J. W. (2005). HPLC–SPE–NMR hyphenation in natural products research: Optimization of analysis of Croton membranaceus extract. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 43(9), 771–775.
- Ndjoko, K., Wolfender, J.-L., Röder, E., & Hostettmann, K. (1999). Determination of pyrrolizidine alkaloids in senecio species by liquid chromatography/thermospray-mass spectrometry and liquid chromatography/nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Planta Medica*, 65(06), 562–566.
- Pham, L. H., Vater, J., Rotard, W., & Mügge, C. (2005). Identification of secondary metabolites from *Streptomyces violaceoruber* TŮ22 by means of on-flow LC–NMR and LC–DAD–MS. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 43(9), 710–723.
- Qu, J., Hu, Y. C., Li, J. B., Wang, Y. H., Zhang, J. L., Abliz, Z., et al. (2008). Structural characterization of constituents with molecular diversity in fractions from *Lysidice brevicalyx* by liquid chromatography/diode-array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry and liquid chromatography/nuclear magnetic resonance. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 22(6), 755–765.
- Queiroz, E. F., Ioset, J. R., Ndjoko, K., Guntern, A., Foggin, C. M., & Hostettmann, K. (2005). On-line identification of the bioactive compounds from *Blumea gariepina* by HPLC–UV–MS and HPLC–UV–NMR, combined with HPLC–micro–fractionation. *Phytochemical Analysis*, 16(3), 166–174.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie, International Edition*, 50(3), 586–621.
- Ramawat, K. G., Dass, S., & Mathur, M. (2009). The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants. In *Herbal Drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine* (pp. 7–32). Berlin Heidelberg: Springer.
- Schefer, A. B., Braumann, U., Tseng, L.-H., Spraul, M., Soares, M. G., Fernandes, J. B., et al. (2006). Application of high-performance liquid chromatography–nuclear magnetic resonance coupling to the identification of limonoids from mahogany tree (*Swietenia macrophylla*, Meliaceae) by stopped-flow 1D and 2D NMR spectroscopy. *Journal of Chromatography. A*, 1128(1–2), 152–163.
- Silva Elipe, M. V. (2003). Advantages and disadvantages of nuclear magnetic resonance spectroscopy as a hyphenated technique. *Analytica Chimica Acta*, 497(1–2), 1–25.
- Sorensen, D., Raditsis, A., Trimble, L. A., Blackwell, B. A., Sumarah, M. W., & Miller, J. D. (2006). Isolation and structure elucidation by LC–MS–SPE/NMR: PR toxin- and cuspidatol-related eremophilane sesquiterpenes from *Penicillium roqueforti*. *Journal of Natural Products*, 70(1), 121–123.
- Spring, O., Buschmann, H., Vogler, B., Schilling, E. E., Spraul, M., & Hoffmann, M. (1995). Sesquiterpene lactone chemistry of *Zaluzania grayana* from on-line LC–NMR measurements. *Phytochemistry*, 39(3), 609–612.
- Spring, O., Heil, N., & Vogler, B. (1997). Sesquiterpene lactones and flavanones in *Scalesia* species. *Phytochemistry*, 46(8), 1369–1373.
- Staerk, D., Kesting, J. R., Sairafianpour, M., Witt, M., Asili, J., Emami, S. A., et al. (2009). Accelerated dereplication of crude extracts using HPLC–PDA–MS–SPE–NMR: Quinolinone alkaloids of *Haplophyllum acutifolium*. *Phytochemistry*, 70(8), 1055–1061.
- Stintzing, F. C., Conrad, J., Klaiber, I., Beifuss, U., & Carle, R. (2004). Structural investigations on betacyanin pigments by LC NMR and 2D NMR spectroscopy. *Phytochemistry*, 65(4), 415–422.
- Stoessl, A., Stothers, J. B., & Ward, E. W. B. (1976). Sesquiterpenoid stress compounds of the solanaceae. *Phytochemistry*, 15(6), 855–872.
- Sturm, S., & Seger, C. (2012). Liquid chromatography–nuclear magnetic resonance coupling as alternative to liquid chromatography–mass spectrometry hyphenations: Curious

- option or powerful and complementary routine tool? *Journal of Chromatography. A*, 1259, 50–61.
- Sturm, S., Seger, C., Godejohann, M., Spraul, M., & Stuppner, H. (2007). Conventional sample enrichment strategies combined with high-performance liquid chromatography-solid phase extraction-nuclear magnetic resonance analysis allows analyte identification from a single minuscule *Corydalis solida* plant tuber. *Journal of Chromatography. A*, 1163(1–2), 138–144.
- Tatsis, E. C., Boeren, S., Exarchou, V., Troganis, A. N., Vervoort, J., & Gerothanassis, I. P. (2007). Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. *Phytochemistry*, 68(3), 383–393.
- Timmers, M., & Urban, S. (2012). On-line (HPLC-NMR) and off-line phytochemical profiling of the Australian plant, *Lasiopetalum macrophyllum*. *Natural Product Communications*, 7(5), 551–560.
- Tode, C., Maoka, T., & Sugiura, M. (2009). Application of LC-NMR to analysis of carotenoids in foods. *Journal of Separation Science*, 32(21), 3659–3663.
- Tseng, L., Braumann, U., Godejohann, M., Lee, S., & Albrecht, K. (2000). Structure identification of aporphine alkaloids by on-line coupling of HPLC-NMR with Loop-storage. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 47(6), 1231–1236.
- Tsimogiannis, D., Samiotaki, M., Panayotou, G., & Oreopoulou, V. (2007). Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules*, 12(3), 593–606.
- Watanabe, B. N., & Niki, E. (1979). An experiment on direct combination of high performance liquid chromatography with FT-NMR (LC-NMR). *JEOL News*, 15(A), 194–199.
- Wolfender, J.-L., Ndjoko, K., & Hostettmann, K. (2001). The potential of LC-NMR in phytochemical analysis. *Phytochemical Analysis*, 12(1), 2–22.
- Wolfender, J.-L., Queiroz, E. F., & Hostettmann, K. (2005). Phytochemistry in the microgram domain—A LC-NMR perspective. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 43(9), 697–709.
- Wolfender, J.-L., Rodriguez, S., Hostettmann, K., & Hiller, W. (1997). Liquid chromatography/ultra violet/mass spectrometric and liquid chromatography/nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of crude extracts of Gentianaceae species. *Phytochemical Analysis*, 8(3), 97–104.
- Xiao, H. B., Krucker, M., Putzbach, K., & Albert, K. (2005). Capillary liquid chromatography-microcoil ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy and liquid chromatography-ion trap mass spectrometry for on-line structure elucidation of isoflavones in *Radix astragali*. *Journal of Chromatography. A*, 1067(1–2), 135–143.
- Xu, F., & Alexander, A. J. (2005). The design of an on-line semi-preparative LC-SPE-NMR system for trace analysis. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 43(9), 776–782.
- Zanolari, B., Wolfender, J. L., Guilet, D., Marston, A., Queiroz, E. F., Paulo, M. Q., et al. (2003). On-line identification of tropene alkaloids from *Erythroxylum vacciniifolium* by liquid chromatography-UV detection-multiple mass spectrometry and liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, 1020(1), 75–89.
- Zhao, Y., Nookandeh, A., Schneider, B., Sun, X., Schmitt, B., & Stöckigt, J. (1999). Lignans from *Torreya jackii* identified by stopped-flow high-performance liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Chromatography. A*, 837(1–2), 83–91.
- Ziegler, J., & Facchini, P. J. (2008). Alkaloid biosynthesis: Metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 735–769.

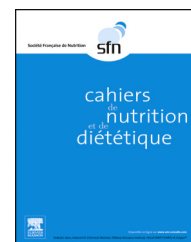


Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



ALIMENTS

Stilbènes : de la chimie à la neuroprotection[☆]



Stilbenes: From chemistry to neuroprotection

**Tristan Richard^{*}, Hamza Temsamani,
Jean-Claude Delaunay, Stéphanie Krisa,
Jean-Michel Mérillon**

*ISVV, EA 3675 GESVAB, université de Bordeaux, 210, chemin de Leysotte, CS 50008,
33882 Villenave d'Ornon cedex, France*

Reçu le 1^{er} février 2014 ; accepté le 28 février 2014
Disponible sur Internet le 13 avril 2014

MOTS CLÉS

Stilbène ;
Resvératrol ;
Neuroprotection

KEYWORDS

Stilbenoid;
Resveratrol;
Neuroprotection

Résumé Les stilbènes constituent une grande famille de composés phénoliques incluant des monomères (comme le resvératrol) et des oligomères (dimères, trimère, etc.). Le stilbène le plus étudié, le resvératrol possède de multiples activités biologiques contre plusieurs maladies chroniques et en particulier contre les maladies neurodégénératives. Il a également été montré que les autres stilbènes pourraient avoir un effet bénéfique sur la santé. Dans cette revue, nous présentons la chimie et les effets neuroprotecteurs des stilbènes.

© 2014 Société française de nutrition. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Summary Stilbenes constitute a large class of phenolic compounds, including monomers (such as resveratrol) and oligomers (dimers, trimers, etc.). The most studied stilbene, resveratrol, exhibits multiple biological activities across multiple diseases including neurodegenerative diseases. Interestingly, other stilbenes also have beneficial activities. This review summarizes the chemistry and the neuroprotective effects of stilbenes.

© 2014 Société française de nutrition. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction

Les polyphénols constituent une vaste famille de métabolites secondaires naturels constituée de plusieurs milliers de molécules. Ces composés font l'objet de nombreuses études en raison de leurs effets bénéfiques sur la santé humaine. Ils seraient, par exemple,

[☆] Texte issu d'une conférence de Tristan Richard aux JFN de Bordeaux, décembre 2013.

^{*} Auteur correspondant.

Adresse e-mail : tristan.richard@u-bordeaux.fr (T. Richard).

à l'origine du « French Paradox » [1]. En effet, de nombreuses études ont montré une corrélation entre une consommation modérée de vin et une diminution du risque de cancers, des maladies cardiovasculaires et neurodégénératives [2]. Les polyphénols seraient à l'origine de cette corrélation [3].

Parmi les polyphénols du vin, de nombreux auteurs considèrent le resvératrol comme étant l'une des molécules responsables du « French Paradox » [4]. Ce stilbène est un puissant antioxydant qui possède de nombreuses propriétés biologiques. En particulier, il a été montré que le resvératrol pourrait prévenir les maladies neurodégénératives [5].

Le resvératrol est la brique de base des stilbènes de la vigne [6]. Ces composés présentent une grande diversité de structures. Plusieurs travaux ont montré que les stilbènes présentent des activités biologiques potentiellement bénéfiques pour la santé. Le présent article est consacré aux effets protecteurs des dérivés du resvératrol sur les maladies neurodégénératives.

Les polyphénols

Les composés phénoliques sont des composés naturels présents dans la quasi-totalité des plantes et retrouvés dans presque toutes les parties de la plante. Les composés phénoliques sont principalement synthétisés par la voie shikimate. Ces métabolites secondaires sont caractérisés par la présence d'au moins un groupement hydroxyle greffé sur un cycle aromatique. Les composés phénoliques présentent une grande diversité de structures, plusieurs milliers de composés différents ont été identifiés dans la nature [7]. Les polyphénols peuvent être classés en deux groupes : les composés flavonoïdes et les composés non flavonoïdes. Les flavonoïdes sont caractérisés par une structure particulière carbonée en C₆-C₃-C₆ (participation de la voie malonate à leur biosynthèse). Les flavonoïdes sont des composés très souvent colorés et principalement présents sous formes glycosylées dans les plantes. Les flavonoïdes regroupent plusieurs familles de composés : flavonols, flavanols, flavones, isoflavones, flavanones et anthocyanes. Les composés non flavonoïdes peuvent également être décomposés en plusieurs familles : acides phénols et dérivés, lignanes et stilbènes.

Les composés phénoliques sont présents dans de nombreuses sources alimentaires : café, thé, chocolat, vins, fruits, oléagineux, soja, etc. [8]. Ces composés sont connus pour leurs nombreuses propriétés biologiques et leur impact bénéfique sur la santé humaine [9]. De plus, les polyphénols constituent une famille de composés importante dans le domaine de l'agroalimentaire car ils influent sur la qualité des produits alimentaires [10]. Et enfin, les polyphénols sont impliqués dans les mécanismes de croissance et de protection des plantes (Tableau 1).

Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés non flavonoïdes présentant une structure carbonée particulière en C₆-C₂-C₆ [11]. Cette structure de base relativement simple donne naissance à un grand nombre de composés qui vont différer par le nombre et les positions des fonctions hydroxyles sur les cycles phénoliques, la conjugaison avec des sucres et des groupes fonctionnels divers (méthyles, méthoxyles, etc.) et la

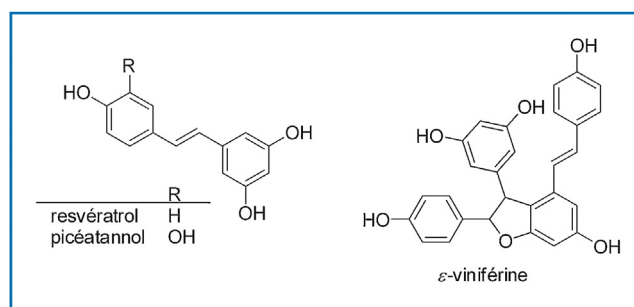


Figure 1. Les stilbènes.

formation d'oligomères résultant de la condensation oxydative des monomères (Fig. 1).

Ces composés ont été identifiés dans de nombreuses familles de plantes : Melanthiaceae, Polygonaceae, Moraceae, Vitaceae, etc. Ils sont également présents dans diverses sources alimentaires comme le raisin, les fruits rouges, les cacahouètes ou la rhubarbe. Les teneurs varient de quelques milligrammes à quelques centaines de milligrammes par kilogramme de matière sèche [8]. On les trouve également dans diverses plantes médicinales comme la renouée du Japon (*Polygonum cuspidatum*) ou le vérâtre (*Veratrum album* et *Veratrum formosanum*). La vigne et ses dérivés (raisin de table, jus de raisin, vin) constituent la principale source de stilbènes du régime alimentaire occidental. La concentration en stilbènes dans le vin est de l'ordre de la dizaine de milligrammes par litre [12].

Le resvératrol est le stilbène le plus reconnu dans le monde. Ce composé a été identifié, à l'origine, comme étant une phytoalexine de la vigne [13]. Il a été montré que ce composé présente de nombreuses activités biologiques potentiellement bénéfiques pour la santé humaine [14]. Le resvératrol est considéré comme un puissant antioxydant et possède des propriétés anti-inflammatoires. Son fort potentiel antioxydant a été associé aux effets bénéfiques d'une consommation modérée de vin sur la santé dans le cas des maladies cardiovasculaires. Il présente également des propriétés anticancéreuses. Enfin, il posséderait des propriétés antiviellissement et pourrait prévenir certaines maladies neurodégénératives. En écho à ces résultats, des travaux ont été réalisés afin de mettre en évidence des propriétés biologiques d'autres stilbènes. Ces composés se révèlent très souvent au moins aussi efficaces que le resvératrol. Il a été montré que le pouvoir antioxydant du picéide (resvératrol 3-O-β-glucoside) est comparable ou supérieur à celui du resvératrol [15]. L'hopéaphénol et la vitisine A, deux oligomères, inhibent plus efficacement que le resvératrol, la propagation des lignées cellulaires tumorales canines [16]. L'ε-viniférine glucoside et la scirpusine A, deux dimères, présentent une meilleure inhibition de l'agrégation du peptide β-amyloïde, peptide impliqué dans la maladie d'Alzheimer, que le resvératrol [17]. Cependant, de manière générale les travaux sur les analogues du resvératrol sont moins nombreux et moins documentés.

Biodisponibilité du resvératrol

Tout comme pour les activités biologiques, la plupart des études sur la biodisponibilité des stilbènes concernent uniquement le resvératrol. La biodisponibilité du resvératrol a été aussi bien étudiée sur des modèles animaux que

Tableau 1 Exemple de quelques composés phénoliques : sources, effets et usages.

Famille	Exemple	Source	Effets et usages
Anthocyanes	Cyanidine	Fruits rouges	Attraction des animaux (pigments)
Flavonols	Quercétine	Thé, pomme, oignon	Protection contre les UV
Flavanols	Catéchine	Chocolat, thé	Antimicrobien, herbicide
Flavanones	Naringénine	Raisin, orange, tomate	Amertume
Flavones	Apigénine	Persil, céleri, poivron	Protection contre les UV
Isoflavones	Génistéine	Soja	Propriétés antimicrobiennes
Lignanes	Entérodiol	Céréales, soja, fraise	Fonctions structurales
Stilbènes	Resvératrol	Raisin, cacahouètes	Phytoalexine
Coumarines	Umbéliciférone	Carotte	Phytoalexine
Acides phénylpropanoïques	Acide caféïque	Fraise, raisin	Précurseur de nombreux autres composés phénoliques
Dérivés de l'acide benzoïque	Acide salicylique	Salade, pomme, prune	Résistance aux pathogènes

chez l'homme [18]. Le resvératrol est absorbé au niveau de l'intestin à plus de 70 % chez le rat [19]. Il est ensuite conjugué principalement sous forme de glucuronides, même si des sulfoconjuguaisons ont été également observées [19,20].

La distribution du ^{14}C -resvératrol dans les tissus a été étudiée dans notre laboratoire chez la souris [21]. Les concentrations en resvératrol ont été mesurées dans différents organes 3 h après une administration par voie orale. De la radioactivité a été observée dans le cerveau, les poumons, le cœur, le foie, les reins, la rate, le duodénum, le côlon et les testicules. Les concentrations les plus élevées ont été mesurées dans le duodénum et les reins tandis que les plus faibles l'ont été dans le cœur, les testicules et le cerveau. Ces résultats montrent que le resvératrol ou ses métabolites peuvent pénétrer les tissus.

Stilbènes et maladies neurodégénératives

Les maladies neurodégénératives sont devenues, de nos jours, un problème de santé publique majeur. Pour un certain nombre de ces pathologies, comme la maladie d'Alzheimer, il n'existe pas à proprement parler de traitement. La découverte de composés permettant de prévenir et de traiter les pathologies du cerveau est donc un des défis majeurs de la recherche médicale. De nombreux travaux ont montré que les polyphénols auraient un effet potentiellement bénéfique pour prévenir les maladies neurodégénératives. Les stilbènes, et en particulier le resvératrol, font partie de ces polyphénols d'intérêt [3,5].

Tout comme dans le cas de la biodisponibilité, la majorité des études sur les effets neuroprotecteurs des stilbènes a porté sur le resvératrol. De nombreuses études ont montré que le resvératrol pourrait avoir un effet préventif sur diverses pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson [22,23]. Ces travaux montrent que le resvératrol est capable de moduler les processus dégénératifs en suivant différents mécanismes.

Prenons en considération la maladie d'Alzheimer, la principale maladie neurodégénérative (Fig. 2). Cette maladie se caractérise par l'accumulation excessive de deux protéines qui entraînent un dysfonctionnement cellulaire : la protéine τ et le peptide β -amyloïde (βA) [25]. La protéine τ intervient dans la stabilisation du cytosquelette des neurones par interaction avec les microtubules. La formation intracellulaire d'amas anormaux de cette protéine hyperphosphorylée est un marqueur de la maladie d'Alzheimer. Associée à

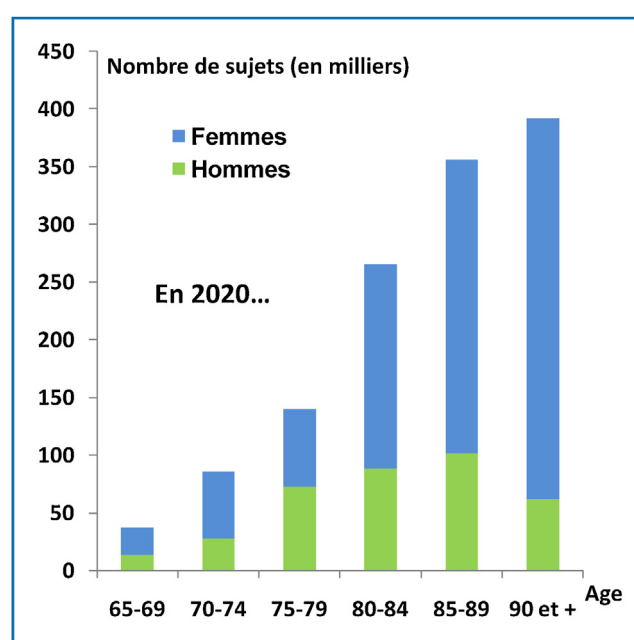
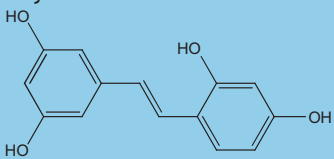
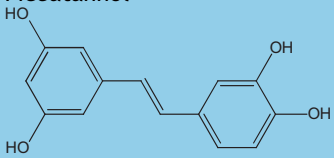
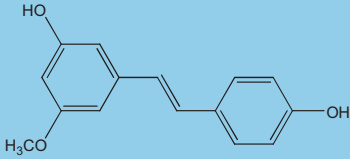
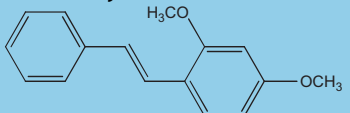
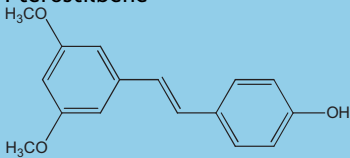
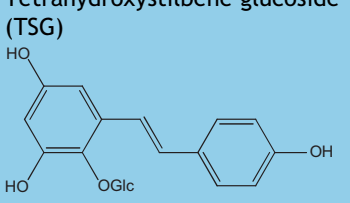
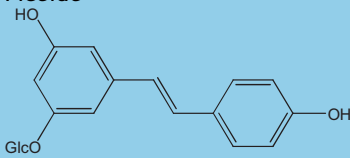
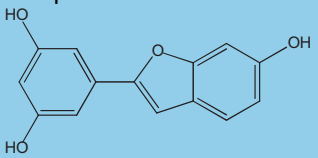


Figure 2. Estimation en fonction de l'âge du nombre de personnes atteintes de démence en France métropolitaine en 2020. D'après le rapport Gallez [24].

l'agrégation de la protéine τ , l'agrégation extracellulaire du βA est le second marqueur de la maladie d'Alzheimer. La formation du βA provient du clivage protéolytique de la protéine transmembranaire APP (*Amyloid Protein Precursor*) successivement par deux enzymes, une β -sécrétase et une γ -sécrétase. L'agrégation de ce peptide insoluble et toxique est à l'origine des plaques amyloïdes, ou plaques séniles. Cette accumulation de protéines est à l'origine d'un stress oxydant et d'un processus inflammatoire qui entraînent un dysfonctionnement des neurones environnants. Cette cascade amyloïde est à l'origine de la mort des neurones (Fig. 3).

Il a été montré que le resvératrol était capable de moduler plusieurs étapes de la cascade amyloïde. Il protège des lignées cellulaires PC12 contre la toxicité induite par le βA en réduisant l'accumulation intracellulaire des espèces réactives à l'oxygène (ROS) [26]. Le resvératrol permet aussi d'inhiber ou de réguler un certain nombre de médiateurs chimiques de l'inflammation sur des cellules microgliales comme la modulation d'enzymes telles

Tableau 2 Effets neuroprotecteurs de quelques stilbènes monomères (resvératrol exclu).

Stilbène	Effets biologiques	Modèle	Références
Oxyresvératrol 	Passage barrière hémato-encéphalique Inhibition effets neurotoxiques du β A Inhibition β -sécrétase Inhibition neurotoxicité induite par 6-OHDA	In vivo (rat) In vitro (neurone) In vitro In vitro (SH-SY5Y)	[30] [31] [32] [33]
Picéatannol 	Effets anti-inflammatoires Inhibition effets neurotoxiques du β A	In vitro (BV2) In vitro (PC12)	[34] [35]
Pinostilbène 	Inhibition neurotoxicité induite par 6-OHDA Effets antioxydants	In vitro (SH-SY5Y)	[36]
Diméthoxystilbène 	Réduction des déficits cognitifs induits par β A	In vivo (rat)	[37]
Ptérostilbène 	Passage barrière hémato-encéphalique Modulation des fonctions cognitives Modulation du stress cellulaire plus efficace que resvératrol	In vivo (souris)	[38]
Tétrahydroxystilbène glucoside (TSG) 	Protection contre ischémie cérébrale Modulation du stress cellulaire Réduction surexpression précurseurs A β induits par aluminium Effets antioxydants et neuromodulateurs Modulation plasticité synaptique	In vivo (souris) In vivo (rats) In vitro (PC12) In vitro (PC12)	[39] [40] [41] [42]
Picéide 	Inhibition agrégation β A	In vitro	[43]
Véraphénol 	Inhibition β -sécrétase	In vitro	[32]

que les lipoxygénases et les cyclo-oxygénases, l'inhibition de l'oxyde nitrique synthase inducible (iNOS), de la production de cytokines et des facteurs de transcription [27]. Le resvératrol réduit la sécrétion de β A sur de lignées cellulaires transfectées par le gène de l'*APP 695*, sans affecter

directement les sécrétases induites dans la synthèse du β A [28]. Cette réduction s'effectuerait au travers de l'activation du protéasome. Le resvératrol inhibe également l'agrégation du peptide β A et ce de manière spécifique [29]. Tous ces résultats indiquent que le resvératrol est un

Tableau 3 Effets neuroprotecteurs de quelques oligomères de stilbènes.

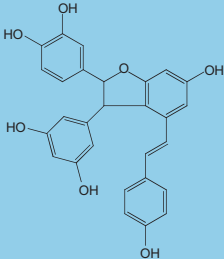
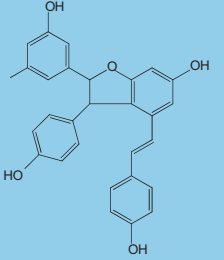
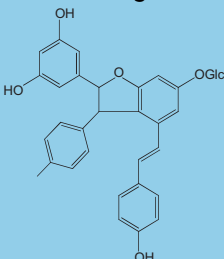
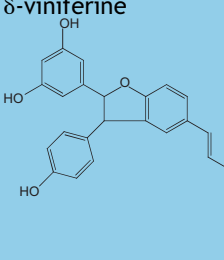
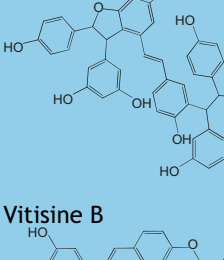
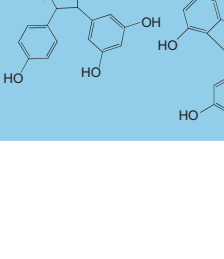
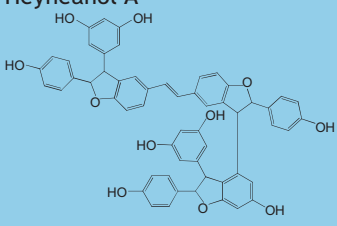
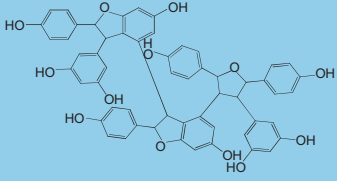
Stilbène	Effets biologiques	Modèle	Réf.
Scirpusine A 	Inhibition β -sécrétase Inhibition agrégation β A	In vitro In vitro	[32] [17]
ϵ-viniférine 	Protection contre ischémie cérébrale Effets anti-inflammatoires	In vitro (neurone) In vitro (BV2)	[44] [45]
ϵ-viniférine glucoside 	Inhibition agrégation β A Inhibition neurotoxicité induite par β A	In vitro In vitro (PC12)	[17] [47]
δ-viniférine 	Effets anti-inflammatoires	In vitro (BV2)	[45]
Vitisine A 	Inhibition neurotoxicité induite par β A Effets anti-inflammatoires	In vitro (PC12) In vitro (BV2)	[46] [45]
Vitisine B 	Effets anti-inflammatoires	In vitro (BV2)	[45]

Tableau 3 (Suite)

Stilbène	Effets biologiques	Modèle	Réf.
Heynéanol A 	Inhibition neurotoxicité induite par β A	In vitro (PC12)	[46]
Kobophénol A 	Effets antioxydants	In vitro (SH-SY5Y)	[48]

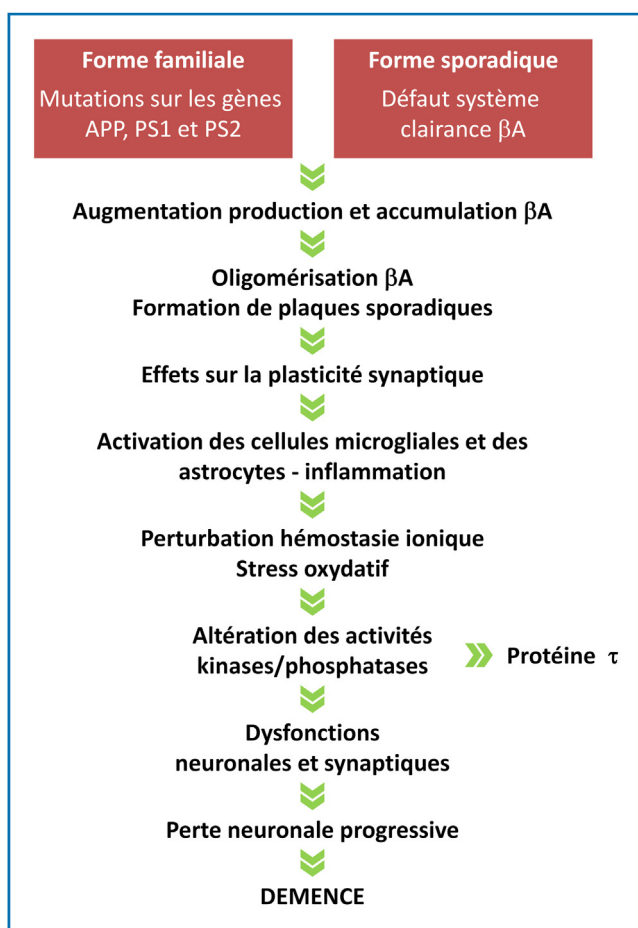


Figure 3. Schéma de la cascade amyloïde.
D'après Hardy et al. [25].

composé naturel pouvant jouer un rôle protecteur vis-à-vis de la maladie d'Alzheimer. Les effets neuroprotecteurs du resvératrol font l'objet d'évaluations cliniques. Aux États-Unis, une étude clinique en phase 2, soutenue par le National Institute on Aging (NIA), intitulée « Resveratrol for Alzheimer's Disease », a été lancée. Les résultats de cette étude devraient paraître en 2015.

Même si la plupart des études sur les effets neuroprotecteurs des stilbènes portent sur le resvératrol, un certain nombre d'études indiquent que d'autres stilbènes possèdent des propriétés neuroprotectrices. Le Tableau 2 résume les effets neuroprotecteurs potentiels de quelques monomères de stilbènes et le Tableau 3 de quelques oligomères.

Nous avons récemment montré dans notre laboratoire que certains stilbènes avaient un effet inhibiteur sur l'agrégation du β A [17]. Dans cette étude divers stilbènes ont été testés, et parmi eux cinq composés ont présenté une activité supérieure à la curcumine, polyphénol du curcuma, connu pour son action inhibitrice de l'agrégation du β A (Tableau 4). Ces cinq composés sont le resvératrol, son glucoside le picéide, l'ampélopsine A,

Tableau 4 Effets inhibiteurs sur l'agrégation du peptide β -amyloïde.

Composé	Inhibition (%)	EC ₅₀ (μ M)
<i>Curcumine</i>	45 \pm 9	10 \pm 2
<i>Monomères</i>		
Resvératrol	63 \pm 6	6 \pm 2
Picéide	62 \pm 6	6 \pm 2
Picéatannol	25 \pm 9	—
Ptérostilbène	35 \pm 7	—
Oxyresvératrol	32 \pm 7	—
<i>Dimères</i>		
Ampélopsine A	46 \pm 6	10 \pm 2
Scirpusine A	80 \pm 9	0,7 \pm 0,3
ϵ -viniférine	25 \pm 9	—
ϵ -viniférine glucoside	93 \pm 3	0,2 \pm 0,3
<i>Oligomères</i>		
Myabénol C	15 \pm 5	—
Népalensinol B	17 \pm 7	—
Hopéaphénol	13 \pm 6	—
Isohopéaphénol	21 \pm 9	—
Vitisine C	32 \pm 9	—
Viniférol E	17 \pm 10	—

En gras : composés ayant une activité supérieure à la curcumine.

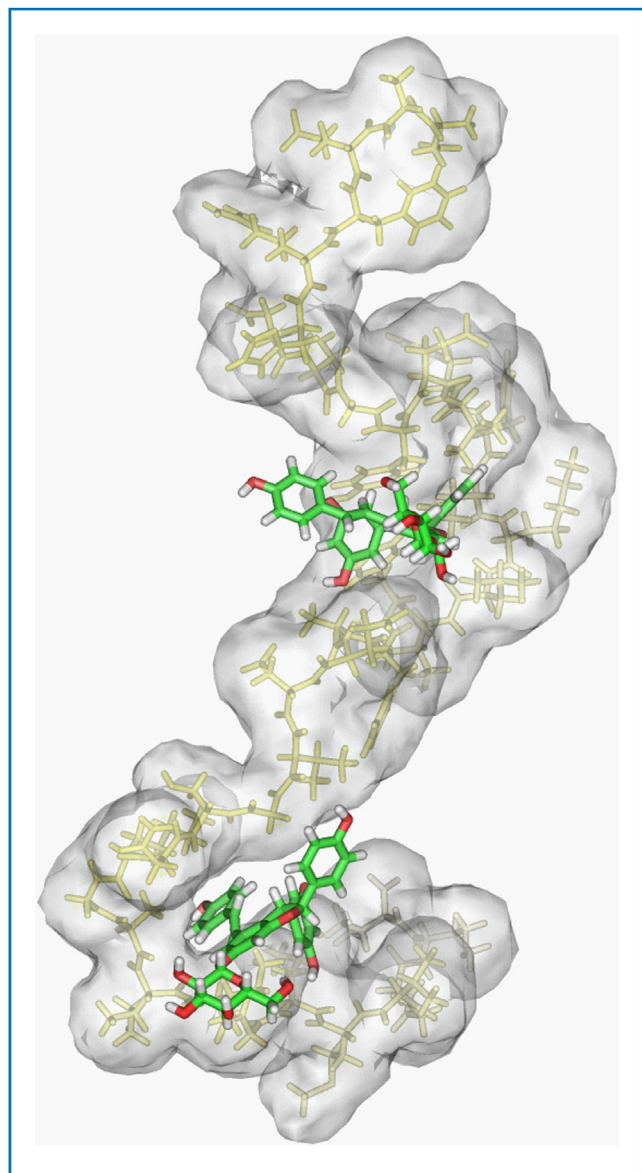


Figure 4. Complexe moléculaire ϵ -viniférine glucoside/ β A.

l' ϵ -viniférine glucoside et la scirpusine A. L'analyse de ces résultats montre qu'il existe une relation structure-activité spécifique. Les dimères (ϵ -viniférine glucoside et la scirpusine A) sont les composés les plus actifs. Les oligomères ($n > 2$) sont globalement peu actifs. Ce résultat indiquerait que l'encombrement spatial de ces composés inhiberait l'interaction avec le peptide. Des travaux complémentaires réalisés sur l' ϵ -viniférine glucoside ont montré que ce composé inhibait la cytotoxicité induite par le β A sur des lignées cellulaires PC12 [47]. Une étude des mécanismes d'interaction par spectrométrie de masse et RMN a montré que l'inhibition de l'agrégation du β A se ferait à un stade précoce du processus de formation des fibres amyloïdes [49]. Ces travaux ont mis en évidence la formation d'un complexe entre deux molécules de polyphénol et une molécule de β A (Fig. 4). La formation de ce complexe pourrait empêcher le changement de conformation du peptide et donc prévenir son agrégation. En parallèle de ces travaux, nous avons également montré que les stilbènes avaient un effet protecteur vis-à-vis de l'inflammation induite par les lipopolysaccharides sur des cellules microgliales (lignée cellulaire BV2). En effet, le resvératrol, le picéatannol, l' ϵ -viniférine

ou les vitisines A et B ont la capacité d'inhiber la production d'un marqueur de l'inflammation, le monoxyde d'azote, en diminuant pour certains l'expression des protéines et gènes correspondants [45].

Conclusion

L'ensemble des travaux présentés montre que, parmi tous les polyphénols, les stilbènes (dérivés du resvératrol) pourraient être bénéfiques pour prévenir les maladies neurodégénératives. La plupart des travaux réalisés concernent le resvératrol. Ces travaux indiquent que ce composé peut agir sur plusieurs cibles différentes liées au processus neurodégénératif. Actuellement une étude clinique est en cours aux États-Unis pour évaluer les effets du resvératrol sur la maladie d'Alzheimer. De plus en plus de travaux indiquent que les autres stilbènes constituent également des composés potentiellement intéressants pour la santé. Pour mieux comprendre les mécanismes d'action de ces composés, il est nécessaire de poursuivre ces travaux.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs collaborent avec la Société ACTICHEM.

Références

- [1] Renaud S, Lorget M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992;339:1523–6.
- [2] Gronbaek M, Deis A, Sorensen T, et al. Mortality associated with moderate intakes of wine, beer, or spirits. *BMJ* 1995;310:1165.
- [3] Sun AY, Simonyi A, Sun GY. The "French Paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radic Biol Med* 2002;32:314–8.
- [4] Fernández-Mar MI, Mateos R, García-Parrilla MC, et al. Bioactive compounds in wine: resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: a review. *Food Chem* 2012;130:797–813.
- [5] Ramassamy C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *Eur J Pharmacol* 2006;545:51–64.
- [6] Pawlus AD, Waffo-Teguo P, Shaver J, et al. Stilbenoid chemistry from wine and the genus *Vitis*. *J Int Sci Vigne Vin* 2012;46:57–111.
- [7] Bruneton J. Pharmacognosie—Phytochimie, plantes médicinales. 4^e éd. Paris: Tec & Doc—Éditions médicales internationales; 2009 [revue et augmentée].
- [8] Pérez-Jiménez J, Neveu V, Vos F, et al. A systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages—An application of the Phenol-Explorer database. *J Agric Food Chem* 2010;58:4959–69.
- [9] Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, et al. Plant polyphenols: chemical properties. Biological activities and synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* 2001;50:586–621.
- [10] Collin S, Crouzet J. Polyphénols et procédés. Paris: Tec & Doc; 2011. p. 1–337.
- [11] Rivière C, Pawlus AD, Mérillon JM. Natural stilbenes: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in vitaceae. *Nat Prod Rep* 2012;29:1317–33.
- [12] Stervbo U, Vang O, Bonnesen C. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chem* 2007;101:449–57.
- [13] Jeandet P, Douillet-Breuil AC, Bessis R, et al. Phytoalexins from the vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity and metabolism. *J Agric Food Chem* 2002;50:2731–41.

- [14] Vang O, Ahmad N, Baile CA, et al. What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PLoS One* 2011;6:e19881 [doi:10.1371/journal.pone.0019881].
- [15] Su D, Cheng Y, Liu M, et al. Comparison of piceid and resveratrol in antioxidation and antiproliferation activities in vitro. *PLoS One* 2013;8:e54505 [doi:10.1371/journal.pone.0054505].
- [16] Empl MT, Macke S, Winterhalter P, et al. The growth of the canine glioblastoma cell line D-GBM and the canine histiocytic sarcoma cell line DH82 is inhibited by the resveratrol oligomers hopeaphenol and r2-viniferin. *Vet Comp Oncol* 2012;10:999 [doi:10.1111/j.1476-5829.2012.00349].
- [17] Rivière C, Papastamoulis Y, Fortin PY, et al. New stilbene dimers against amyloid fibril formation. *Bioorg Med Chem Lett* 2010;20:3441–3.
- [18] Soleas GJ, Yan J, Goldberg DM. Measurement of trans-resveratrol, (+)-catechin, and quercetin in rat and human blood and urine by gas chromatography with mass selective detection. *Methods Enzymol* 2001;335:130–45.
- [19] Soleas GJ, Angelini M, Grass L, et al. Absorption of trans-resveratrol in rats. *Methods Enzymol* 2001;335:145–54.
- [20] Aumont V, Krisa S, Battaglia E, et al. Regioselective and stereospecific glucuronidation of trans- and cis-resveratrol in human. *Arch Biochem Biophys* 2001;393:281–9.
- [21] Vitrac X, Desmoulière A, Brouillaud B, et al. Distribution of [¹⁴C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Sci* 2003;72:2219–33.
- [22] Anekonda TS. Resveratrol—a boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Res Rev* 2006;52:316–26.
- [23] Jin F, Wu Q, Lu YF, et al. Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. *Eur J Pharmacol* 2008;600:78–82.
- [24] Gallez C. Rapport la maladie d'Alzheimer et les maladies apparentées. Paris: Office parlementaire d'évaluation des politiques de santé; 2005. p. 1–256.
- [25] Hardy JA, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002;297:353–6.
- [26] Jang JH, Surh YJ. Protective effect of resveratrol on β -amyloid-induced oxidative PC12 cell death. *Free Radic Biol Med* 2003;34:1100–10.
- [27] Zhang F, Liu J, Shi JS. Anti-inflammatory activities of resveratrol in the brain: role of resveratrol in microglial activation. *Eur J Pharmacol* 2010;636:1.
- [28] Marambaud P, Zhao H, Davies P. Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid- β peptides. *J Biol Chem* 2005;280:37377–82.
- [29] Rivière C, Richard T, Vitrac X, Méillon JM, Valls J, Monti JP. New polyphenols active on β -amyloid aggregation. *Bioorg Med Chem Lett* 2008;18:828–31.
- [30] Breuer C, Wolf G, Andrabi SA, et al. Blood-brain barrier permeability to the neuroprotectant oxyresveratrol. *Neurosci Lett* 2006;393:113–8.
- [31] Ban JY, Jeon SY, Nguyen TTH, et al. Neuroprotective effect of oxyresveratrol from *Smilax chinae* rhizome on amyloid- β protein (25–35)-induced neurotoxicity in cultured rat cortical neurons. *Biol Pharm Bull* 2006;29:2419–24.
- [32] Jeon SY, Kwon SH, Seong YH, et al. β -secretase (BACE1)-inhibiting stilbenoids from *Smilax Rhizoma*. *Phytomedicine* 2007;14:403–8.
- [33] Chao J, Yu MS, Ho YS, et al. Dietary oxyresveratrol prevents parkinsonian mimetic 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *Free Radic Biol Med* 2008;45:1019–26.
- [34] Jin CY, Moon DO, Lee KJ, et al. Piceatannol attenuates lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation and NF- κ B-related proinflammatory mediators in BV2 microglia. *Pharmacol Res* 2006;54:461–7.
- [35] Kim HJ, Lee KW, Kim MS, et al. Piceatannol attenuates hydrogen-peroxide- and peroxynitrite-induced apoptosis of PC12 cells by blocking down-regulation of Bcl-XL and activation of JNK. *J Nutr Biochem* 2008;19:459–66.
- [36] Chao J, Li H, Cheng KW, et al. Protective effects of pinostilbene, a resveratrol methylated derivative, against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. *J Nutr Biochem* 2010;21:482–9.
- [37] Ruan CJ, Li Z, Zhang L, et al. Protective effects of trans-2, 4-dimethoxystilbene on cognitive, impairments induced by A β 25–35 in hypercholesterolemic rats. *Brain Res Bull* 2010;82:251–8.
- [38] Chang J, Rimando A, Pallas M, et al. Low-dose pterostilbene, but not resveratrol, is a potent neuromodulator in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2012;33:2062–71.
- [39] Wang T, Gu J, Wu PF, et al. Protection by tetrahydroxystilbene glucoside against cerebral ischemia: involvement of JNK, SIRT1, and NF- κ B pathways and inhibition of intracellular ROS/RNS generation. *Free Radic Biol Med* 2009;47:229–40.
- [40] Luo H, Yang J, Shi X, et al. Tetrahydroxystilbene glucoside reduces the cognitive impairment and the overexpression of amyloid precursor protein induced by aluminium exposure. *Neurosci Bull* 2009;25:391–6.
- [41] Li X, Li Y, Chen JG, et al. Tetrahydroxystilbene glucoside attenuates MMP-9 induced apoptosis in PC12 cells by inhibiting ROS generation and modulating JNK activation. *Neurosci Lett* 2010;483:1–5.
- [42] Wang T, Yang YJ, Wu PF, et al. Tetrahydroxystilbene glucoside, a plant-derived cognitive enhancer, promotes hippocampal synaptic plasticity. *Eur J Pharmacol* 2011;650:206–14.
- [43] Rivière C, Richard T, Quentin L, et al. Inhibitory activity of stilbenes on Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. *Bioorg Med Chem* 2007;15:1160–7.
- [44] Kim JY, Jeong HY, Lee HK, et al. Neuroprotection of the leaf and stem of *Vitis amurensis* and their active compounds against ischemic brain damage in rats and excitotoxicity in cultured neurons. *Phytomedicine* 2012;19:150–9.
- [45] Nassra M, Krisa S, Papastamoulis Y, et al. Inhibitory activity of plant stilbenoids against nitric oxide production by lipopolysaccharide-activated microglia. *Planta Med* 2013;79:966–70.
- [46] Jang MH, Piao XL, Kim HY, et al. Resveratrol oligomers from *Vitis amurensis* attenuate β -amyloid-induced oxidative stress in PC12 cells. *Biol Pharm Bull* 2007;30:1130–4.
- [47] Richard T, Poupard P, Nassra M, et al. Protective effect of ϵ -viniferin on β -amyloid peptide aggregation investigated by electrospray ionization mass spectrometry. *Bioorg Med Chem* 2011;19:3152–5.
- [48] Lee SR, Kwak JH, Kim HJ, et al. Neuroprotective effects of kobophenol A against the withdrawal of tropic support, nitrosative stress, and mitochondrial damage in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Bioorg Med Chem Lett* 2007;17:1879–82.
- [49] Richard T, Papastamoulis Y, Waffo-Teguo P, et al. 3D NMR structure of a complex between the amyloid β peptide (1–40) and the polyphenol ϵ -viniferin glucoside: implications in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830:5068–74.